



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií

FUNKCIONALIZACE TKÁŇOVÉHO NOSIČE TROMBOCYTÁRNÍMI RŮSTOVÝMI FAKTORY

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály

Autor práce: **Barbora Kopřivová**
Vedoucí práce: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC

Faculty of Mechatronics, Informatics
Interdisciplinary Studies



FUNCTIONALIZATION OF SCAFFOLDS BY THE PLATELET DERIVED GROWTH FACTORS

Bachelor thesis

Study programme: B3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942R002 – Nanomaterials

Author: **Barbora Kopřivová**
Supervisor: Ing. Věra Jenčová, Ph.D.



Tento list nahradíte
originálem zadání.

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultanty.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 15.5.2015

Podpis:



Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce Ing. Věře Jenčové, Ph.D., konzultantům, Mgr. Kateřině Pilařové a Ing. Aleši Šamanovi za jejich vstřícnost, cenné rady a návrhy, odborné konzultace v dané problematice. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině za vytvoření podmínek pro psaní práce, trpělivost a podporu během celého studia.



Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá využitím elektrostatického rozprašování pro cílené dodávání léčiv a funkcionalizaci scaffoldů trombocytárními růstovými faktory. V teoretické části jsou podány základní informace o tkáňovém inženýrství, biologicky aktivních látkách se zaměřením na trombocyty a jejich růstové faktory, enkapsulaci těchto látek a jejich detekci.

Experimentální část spočívá v přípravě trombocytárního lyzátu, optimalizaci výroby PVA kapslí s bioaktivními látkami a následnou detekci obsažených proteinů ve vytvořených kapslích. Podařilo se nám vytvořit kapsle obsahující trombocytární lyzát, který jsme detekovali pomocí SDS-PAGE. Zjistili jsme, že pokud použijeme menší poměr ethanolu ku vodě při přípravě roztoku PVA, vytváří se nám při electrosprayingu menší kapsle.

Klíčová slova

Elektrostatické rozprašování, Enkapsulace, Růstové faktory, Cílené dodávání léčiv, Funkcionalizace scaffoldů



Abstract

This thesis deals with the use of electrostatic spraying for targeted delivery of drugs and functionalization of scaffolds by platelet-derived growth factors. In the theoretical part are given basic information about tissue engineering, biologically active substances, focusing on platelets and growth factors, encapsulation of these substances and their detection.

Experimental part consists of preparing platelet lysate, optimization of production PVA capsules with bioactive substances and the subsequent detection of the proteins contained in the formed capsules. We managed to create a capsule containing platelet lysate was detected by SDS-PAGE. We have found that if we use a smaller ratio of ethanol to water in preparing the PVA solution, forms in the process of electrospraying smaller capsules.

Keywords

Electrospraying, Encapsulation, Growth factors, Drug delivery system, Functionalization of scaffolds



Obsah

Obsah	- 8 -
Seznam obrázků	- 10 -
Seznam grafů	- 12 -
Seznam tabulek	- 12 -
Seznam zkratk	- 13 -
Úvod	- 16 -
1 Teoretická část	- 16 -
1.1 Tkáňové inženýrství	- 16 -
1.1.1 Scaffoldy pro TE	- 17 -
1.1.2 Materiály používané pro výrobu scaffoldů	- 19 -
1.1.3 Metody výroby	- 20 -
1.2 Elektrostatické zvlákňování a rozprašování	- 20 -
1.2.1 Elektrostatické zvlákňování	- 20 -
1.2.2 Elektrostatické rozprašování	- 21 -
1.2.3 Parametry electrospinningu/electrosprayingu	- 22 -
1.3 Drug delivery system	- 25 -
1.3.1 Kapsle a jejich charakteristika	- 26 -
1.3.2 Enkapsulace	- 27 -
1.4 Biologicky aktivní látky	- 32 -
1.4.1 Proteiny	- 32 -
1.4.2 Analýza proteinů	- 34 -
1.4.3 Růstové faktory	- 38 -
1.4.4 Trombocyty	- 40 -



2	Experimentální část – optimalizace výroby nanokapslí a studium enkapsulace	- 44 -
2.1	Materiály a metody	- 44 -
2.1.1	Použité chemikálie	- 44 -
2.1.2	Vytvořené roztoky	- 45 -
2.1.3	Použitá laboratorní zařízení, přístrojová technika	- 47 -
2.2	Výsledky a diskuze	- 51 -
2.2.1	Příprava trombocytárního lyzátu (TL)	- 51 -
2.2.2	Zařízení pro electrospraying a electrospinningu	- 54 -
2.2.3	Enkapsulace lyzátů do PVA	- 55 -
2.2.4	Vliv koncentrace BSA na velikost částic	- 59 -
2.2.5	Detekce proteinů v kapslích	- 64 -
2.2.6	Metoda podle Bradfordové	- 72 -
	Závěr	- 76 -
	Reference	- 78 -
	Seznam příloh	- 87 -
	Příloha A – Trombocytární přípravek z BC	- 88 -
	Příloha B – SDS-PAGE	- 90 -
	Příloha C – Metoda podle Bradfordové	- 92 -
	Příloha D – Přiložené CD	- 93 -



Seznam obrázků

Obrázek 1: Proces osázení scaffoldu buňkami [3].....	- 17 -
Obrázek 2: Schématické znázornění základního nastavení pro elektrostatické zvlákňování [22].....	- 21 -
Obrázek 3: Schéma electrosprayingu z jehly [24].....	- 22 -
Obrázek 4: Typ biologicky rozložitelných nanočástic [35].....	- 25 -
Obrázek 5: Morfologické typy kapslí	- 26 -
Obrázek 6: Schematické znázornění přípravy zapouzdřené cisplatiny (chemoterapeutikum) pomocí metody dvojité emulgate [42].....	- 28 -
Obrázek 7: Schematické znázornění přípravy mikrokapslí komplexní koacervací pomocí želatiny a arabské gumy [44].....	- 29 -
Obrázek 8: Schéma metody sušení rozprašováním [46].....	- 30 -
Obrázek 9: Různé metody zabudování aktivní látky do polymerních částic přes monoaxiální electrospraying [33]	- 31 -
Obrázek 10: Struktura proteinů [51].....	- 34 -
Obrázek 11: Základní schéma SDS PAGE elektroforézy [54].....	- 35 -
Obrázek 12: Vzorec a princip SDS-PAGE [55].....	- 36 -
Obrázek 13: Schéma složení trombocytu [68].....	- 42 -
Obrázek 14: TRS z 11. 9. 2014 s koncentrací trombocytů $715 \times 10^6/\text{ml}$ z TO KNL ..	- 43 -
Obrázek 15: Separační rozsahy proteinů v denaturační SDS-PAGE [73].....	- 50 -
Obrázek 16: SPS-PAGE elektroforéza	- 50 -
Obrázek 17: Trombocytární lyzát připravený druhou metodou lyzace	- 51 -
Obrázek 18: 8% SDS-PAGE, první příprava lyzátu.....	- 52 -
Obrázek 19: 12 % SDS-PAGE, první příprava lyzátu.....	- 53 -
Obrázek 20: Zařízení pro elektrostatické rozprašování z jehly	- 54 -
Obrázek 21: Schéma zařízení pro electrospraying a electrospinningu	- 55 -
Obrázek 22: Snímek enkapsulovaného lyzátu v PVA, 0. pokus, zvětšeno 10 000x (vlevo) a 40 000x (vpravo).....	- 56 -
Obrázek 23: Snímek enkapsulovaného lyzátu v PVA, 1. pokus, zvětšeno 3 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo).....	- 57 -



Obrázek 24: Snímek enkapsulovaného lyzátu v PVA, 2. pokus, zvětšeno 5 000x (vlevo) a 10 000x (vpravo).....	- 57 -
Obrázek 25: 8% SDS-PAGE enkapsulované lyzáty v PVA.....	- 58 -
Obrázek 26: Snímek PVA kapsle s 0,1 mg/ml BSA, poměr 7:3, zvětšeno 5 000x ...	- 61 -
Obrázek 27: Snímek PVA kapsle s 1 mg/ml BSA, poměr 7:3, zvětšeno 5 000x	- 61 -
Obrázek 28: Snímek PVA kapsle s 10 mg/ml BSA, poměr 7:3, zvětšeno 5 000x	- 62 -
Obrázek 29: Snímek PVA kapsle s 0,1 mg/ml BSA, poměr 9:1, zvětšeno 5 000x	- 62 -
Obrázek 30: Snímek PVA kapsle s 1 mg/ml BSA, poměr 9:1, zvětšeno 5 000x	- 62 -
Obrázek 31: Snímek PVA kapsle s 10 mg/ml BSA, poměr 9:1, zvětšeno 5 000x ...	- 63 -
Obrázek 32: Snímek 1. enkapsulace PVA vlákna a PVA kapsle bez lyzátu, zvětšeno 5 000x	- 65 -
Obrázek 33: Snímek 1. enkapsulace PVA vlákna a PVA kapsle s 1 ml TL, zvětšeno 5 000x	- 65 -
Obrázek 34: Snímek 1. enkapsulace PVA vlákna a PVA kapsle s 2 ml TL, zvětšeno 5 000x	- 66 -
Obrázek 35: 8% SDS-PAGE 1. enkapsulace TL do kapslí s vlákny	- 67 -
Obrázek 36: Snímek 2. enkapsulace PVA vlákna a PVA kapsle s 1 ml lyzátu, zvětšeno 5 000x	- 68 -
Obrázek 37: Snímek 2. enkapsulace PVA vlákna a PVA kapsle s 1,5 ml lyzátu, zvětšeno 5 000x	- 68 -
Obrázek 38: 8% SDS-PAGE 2. enkapsulace TL do kapslí	- 68 -
Obrázek 39: Snímek SEM PVA kapsle bez trombocytárního lyzátu, 20 minut rozprašování.....	- 70 -
Obrázek 40: Snímek PVA kapsle bez trombocytárního lyzátu, 40 minut rozprašování ...	- 70 -
Obrázek 41: Snímek SEM PVA kapsle s 1 ml trombocytárního lyzátu, 20 minut rozprašování.....	- 70 -
Obrázek 42: Snímek SEM PVA kapsle s 1 ml trombocytárního lyzátu, 40 minut rozprašování.....	- 70 -
Obrázek 43: 8% SDS-PAGE, 1. gel 20 minut sprejování	- 71 -
Obrázek 44: 8% SDS-PAGE, 2. gel 40 min a 20 min s TL.....	- 72 -



Seznam grafů

Graf 1: Průměr kapslí v závislosti na koncentraci BSA	- 64 -
Graf 2: Kalibrační křivka BSA	- 73 -
Graf 3: Kalibrační křivka ředěného trombocytárního lyzátu	- 74 -
Graf 4: Množství proteinu dle Bradfordové v kapslích	- 75 -

Seznam tabulek

Tabulka 1: Některé polymery a jejich aplikace [11]	- 19 -
Tabulka 2: Některé důležité biologicky aktivní molekuly obsažené v PRP a jejich fyziologické role [48]	- 32 -
Tabulka 3: Nejdůležitější trombocytární růstové faktory v PRP a jejich molekulové hmotnosti [64, 65]	- 39 -
Tabulka 4: Použité chemikálie	- 44 -
Tabulka 5: Složení jednotlivých roztoků [57, 73]	- 45 -
Tabulka 6: Seznam přístrojů	- 48 -
Tabulka 7: Složení 15% roztoku PVA s 1 ml TL 1., 2. experiment	- 56 -
Tabulka 8: Složení jednotlivých roztoků PVA s BSA	- 60 -
Tabulka 9: Rychlost dávkování pro jednotlivé roztoky v závislosti na koncentraci BSA a poměru rozpouštědla	- 60 -
Tabulka 10: Naměřené průměry PVA kapslí	- 63 -
Tabulka 11: Složení roztoku PVA pro electrospinning 4. a 5. experiment	- 65 -
Tabulka 12: Složení roztoku PVA pro electrospraying 4. a 5. experiment	- 65 -
Tabulka 13: Složení roztoku PVA pro electrospraying 6. experiment	- 69 -
Tabulka 14: Kalibrace BSA roztoku	- 73 -



Seznam zkratek

ADP – Adenosindifosfát

ATP – Adenosintrifosfát

APS – Amonium persulfate, peroxodisíran amonný

BCA – Bicinchoninová kyselina

BSA – Bovine serum albumin, hovězí sérový albumin

CAD/CAM – Počítačem podporovaný design a výroba

CBBG – Coomassie Blue Brilliant G-250

CBBR – Coomassie Blue Brilliant R-250

DD SYSTEM – Drug delivery system, cílené dodávání léčiv

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

EDX – Energiově-díperzní rentgenová analýza

EGF – Epidermální růstový faktor

FGF1 – Fibroblastový růstový faktor I

HA – Kyselina hyaluronová

IGF – Inzulinu podobný růstový faktor I

PAGE – Polyakrylamidová gelová elektroforéza

PCL – Polykaprolakton

PDGFA – Destičkový růstový faktor, alfa polypeptid

PDGFB – Destičkový růstový faktor, beta polypeptid

PDGFC – Destičkový růstový faktor C

PDGFD – Destičkový růstový faktor D

PDO – Polydioxanon



PEG – Polyethylenglykol

PGA – Polyglykolová kyselina

PHA – Polyhydroxy alkonoát

PLA/PLLA – Polymléčná kyselina

PLCL – Polymléčná kyselina-co-kaprolakton

PLGA – Polymléčná-co-glykolová kyselina

PLT – Trombocyt

PPF – Polypropylen fumarát

PRP – Plasma bohatá na trombocyty, platelet-rich plasma

PU – Polyurethan

PVA – Polyvinylalkohol

RF/GF – Růstový faktor, Growth factor

SCPL – Solvent Casting & Particulate Leaching, Metoda rozpouštědlo-odlévání & loužení částic

SDS – Sodiumdodecylsulfát, dodecylsírán sodný

TA – Trombocyty z aferézy

TB – Trombocyty z buffy coatu

TE – Tkáňové inženýrství, tissue engineering

TGFB1 – Transformující růstový faktor beta-I

TL – Trombocytární lyzát

TO KNL - Transfuzní oddělení krajské nemocnice Liberec

TIPS - Thermally induced phase separation, termicky indukovaná fázová separace

TP – Trombocytární přípravky

Tris – Tris(hydroxymethyl)aminomethan



TRS – Trombocytes-rich solution, roztok bohatý na trombocyty

TUL – Technická univerzita v Liberci

VEGFA – Vaskulární endoteliální růstový faktor A

VAGFB – Vaskulární endoteliální růstový faktor B

VEGFC – Vaskulární endoteliální růstový faktor C

vWF – von Willenbrandův faktor



Úvod

V poslední době se věnuje pozornost použití polymerních materiálů v oblasti tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny. Jde především o podpůrné lešení, tzv. scaffoldy, které vytvářejí konstrukci pro novou tkáň. Mohou také obsahovat látky, které pomáhají proliferaci (hojné dělení) a diferenciaci (vývoj strukturně i funkčně specializovaných) buněk. Další možností je výroba polymerních kapslí, které mohou obsahovat biologicky aktivní látky pro podporu růstu či nějaké léčiva a zajišťovat tak cílené dodávání léčiv (Drug delivery system). V současnosti je výzvou uplatnění trombocytů v různých formách pro použití v medicínských oborech. Trombocyty obsahují vysoké množství biologicky aktivních látek, převážně růstové faktory, které podporují nejen proliferaci a diferenciaci buněk, ale také mají protizánětlivé účinky atd. Používají se nativní trombocyty, trombocytární lyzáty, lyofilizáty apod.

1 Teoretická část

1.1 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství (dále TE – tissue engineering) je interdisciplinární obor kombinující konstrukční materiály, buňky a vhodné biochemické faktory pro zlepšení či nahrazení biologické funkce, především lidského těla. V praxi termín TE úzce souvisí s aplikacemi, které jsou potřeba na opravu nebo výměnu části nebo celé tkáně (např. kosti, chrupavky, cévy, močového měchýře, kůže, svalů atd.) Mezi hlavní požadavky na materiály pro TE patří buněčná interakce se scaffoldy, jež je většinou zajištěna vysokoporézním netoxickým biodegradabilním materiálem. Druh, míra poréznosti a další vlastnosti scaffoldu se liší dle aplikace.

Regenerativní medicína je často používána jako synonymum tkáňového inženýrství, i když v regenerativní medicíně je kladen větší důraz na využití kmenových buněk v produkci tkáně. [1, 2]

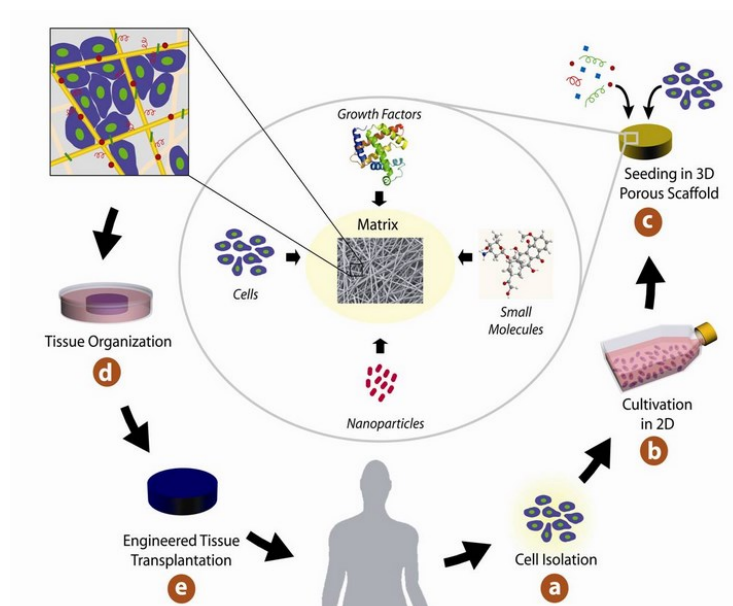
Proces osázení scaffoldu buňkami in vitro (Obr. 1):

- a – izolace buněk
- b – kultivace buněk
- c – osázení scaffoldu (buňky + růstové faktory + malé molekuly + nanočástice)



d – „výroba“ tkáně

e – transplantace nové tkáně



Obrázek 1: Proces osázení scaffoldu buňkami [3]

Existují dva přístupy tkáňového inženýrství. První spočívá v implantaci scaffoldu bez buněk, druhý pak v implantaci scaffoldu, který je in vitro osázen buňkami (pacienta).

1.1.1 Scaffoldy pro TE

Scaffoldy (z ang. lešení) jsou důležitou částí tkáňového inženýrství, ne však bezpodmínečně nutných. Jedním z odvětví TE je i generování tkáně bez exogenního lešení. To znamená, že veškerý materiál v konstrukci je buněčného původu. Jako příklad lze uvést tkáň chrupavky a kůže. Chrupavky mohou být „zlepšeny“ či opraveny chondrocyty, kůže může být naopak „opravena“ či vytvořena samotnými fibroblasty. [4, 5]

Buňky jsou často implantovány nebo "nasazené" do umělé struktury schopné podporovat tkáňové formace.



Scaffoldy obvykle splňují funkce:

- Konstrukční podpora pro zachycení exogenně aplikovaných buněk, jejich růst, migraci a diferenciaci in vitro a in vivo
- Poskytování tvaru a mechanické stability tkáně
- Aktivní interakce s buňkami - podpora proliferace a diferenciaci
- Zásobuje a dodává zevně aplikované stimulující růstové faktory, enzymy a léčiva
- Poskytuje prostor pro prokrvení a tvorbu nové tkáně a její vaskularizaci [6, 7]

Scaffoldy by tedy měly splňovat několik požadavků. Jedná se především o biokompatibilitu, biodegradabilitu, mechanickou podporu, porézní strukturu, interkonektivitu, tkáňově specifická struktura a možnost funkcionalizace biologicky aktivními látkami (DD systém). Biokompatibilita určuje kompatibilitu daného materiálu s konkrétní tkání lidského organismu, rychlost degradace by měla být v nejlepším případě přímo úměrná rychlosti formování tkáně, porézní struktura umožňuje usazení buněk, jejich růst, migraci a transport živin. Interkonektivita zaručuje důležité propojení jednotlivých pórů pro výměnu tekutin, odvod odpadních látek a následné vytvoření nových tkání. Scaffoldy by také měly být sterilizovatelné.

Scaffoldy se mohou rozdělit na vláknenné a nevláknenné. Mezi vláknenné materiály patří tkané či netkané mikrovláknna, nanovláknna (PCL, PVA, PLGA, chitosan, kolagen, ...) a nanokompozitní materiály – například nanovláknna s inkorporovanými částicemi (aktivní uhlí, hydroxyapatit, růstové faktory, lipozomy obsahující aktivní látky aj.). Mezi scaffoldy z nevláknenných materiálů můžeme zařadit kovy (upravené povrchy), keramiku, sklo a hydrogely, což jsou zesíťované (stabilizované vůči rozpouštění ve vodě) hydrofilní polymery. Hydrogely bobtnají v kontaktu s vodou, absorbují její velké množství, ale nedochází k rozkladu či rozpuštění struktury. Díky tomu mají velice podobné vlastnosti jako měkké tkáně. Hydrogely se zdají být neporézní, avšak právě díky průniku vody dochází i k průniku buněk a dalších důležitých látek. Mezi hlavní materiály patří algináty, kyselina hyaluronová, fibrin a modifikovaný polyethylenoxid. Další netkané scaffoldy se připravují z různých syntetických polymerů a přírodních látek. [7, 8]



1.1.2 Materiály používané pro výrobu scaffoldů

Dnes již existuje mnoho druhů scaffoldů. Scaffoldy mohou být dle původu rozděleny na přírodní či syntetické, dle typu na biodegradabilní (biologicky rozložitelné) či permanentní. V dnešní době se TE nejvíce věnuje biologicky rozložitelným materiálům. Většina materiálů byla ve zdravotnictví známa již před příchodem TE, kde byly např. používány jako biologicky resorbovatelné stehy. Jako příklady těchto materiálů lze uvést některé polyestery jako PCL, PLA, PLG, PVA, PGA, PDO, kopolymery PLGA, PLCL aj. Z přírodních materiálů je vhodný také kolagen, chitosan, kyselina hyaluronová (HA) a fibrin.

Současné biomateriály jsou navrženy tak, aby měly ideální vlastnosti dle konkrétní aplikace. Scaffoldy se díky rozdílným materiálům liší biodegradabilitou, průměrem vláken, různou koncentrací, resorpcí, transparentností a výrobou. [8, 9, 10]

Tabulka 1: Některé polymery a jejich aplikace [11]

Polymer/y	Tkáň
PLLA	Kosti, chrupavky, nervy
PGA	Chrupavky, šlachy, střeva, játra, kosti, urotel (močový epitel)
PLGA	Kosti, chrupavky, urotel, nervy, pigmentová vrstva sítnice
PLLA + vlákna PLGA	Hladké svalstvo
PLLA + kolagen (či PVA)	Játra
PLLA + PEG (blokový polymer)	Kosti
PLLA + PEG	Měkké a tubulární tkáně
PDO	Kosti
PHA	Kardiovaskulární tkáň
PCL	Drug delivery systém
PU/PLLA	Malé cévy
PPF	Kosti



1.1.3 Metody výroby

V dnešní době bylo již vyvinutou mnoho metod získávání porézních struktur, které se dají použít jako tkáňové nosiče. Každá z těchto metod má určitou výhodu i nevýhodu oproti ostatním. Jak již bylo zmíněno, na každou tkáň či k určité funkcionalizaci, jsou potřeba nejrůznější vlastnosti materiálů, což představuje také nepřeberné množství výrobních technik. Příkladem výrobní metody mohou být elektrostatické metody, termicky indukované fázové separace (TIPS), emulagace/lyofilizace, metody plyn-pěna, Solvent Casting & Particulate Leaching (SCPL), Self-Assembly, CAD/CAM technologie a různé textilní technologie, atd.[8]

- A. Elektrostatické metody [12]
- B. Termicky indukovaná fázová separace (TIPS) [13, 14]
- C. Emulagace/lyofilizace [15]
- D. Metoda plyn-pěna [15]
- E. Metoda rozpouštědlo-odlévání & loužení částic (SCPL) [15]
- F. Self-Assembly [16, 17]
- G. Počítačem podporovaný design a výroba (CAD/CAM) [18]
- H. Textilní technologie (naplavování, tkaní, pletení, pojení vláken, ...) [19]

U vyrobených scaffoldů jsou následně provedeny testy charakteristiky:

- Morfologie (porozita, velikost pórů, velikost povrchu, průměr vláken)
- Mechanické vlastnosti (pevnost v tahu a tlaku)
- „Objemové“ vlastnosti (doba a mechanismus degradace, změny mechanických vlastností během degradace)
- Vlastnosti povrchu (povrchová energie, chemické složení, náboj)
- Biologické testování (cytotoxicita, biokompatibilita)

1.2 Elektrostatické zvlákňování a rozprašování

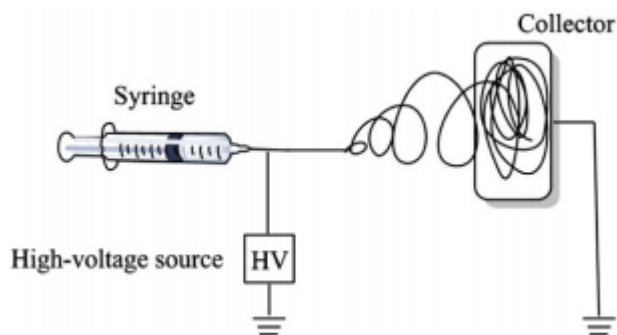
1.2.1 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je důsledkem přetahování mezi elektrostatickými a kapilárními silami. První z nich hovoří o nabitých kapalných subjektech, které se



rozpadají v důsledku dlouhého dosahu odpuzivých sil mezi coulombickými ionty stejného označení, přičemž síla způsobuje, že kapalně částice se hrnou společně, aby se minimalizoval kapalný povrch a povrchová energie, která je výsledkem krátké vzdálenosti mezimolekulární interakce na kvantové úrovni. Tekuté roztoky se mohou rozpadat dvěma možnými způsoby v závislosti na jejich vnitřní molekulární struktuře. Pokud jde o jednoduché kapaliny s malými molekulami, dochází k rozprašování malých nabitých kapiček s tendencí se neustále rozpadat na menší až do jedné jediné s elementárním nábojem, který je uvězněn v každé z nich. [20]

Pokud se ale jedná o kapaliny s vyšší viskozitou, zejména o roztoky polymerů a polymerních tavenin s dostatečně provázanými makromolekulami, roztok se bude rozpadat v malých dlouhých sloupcích při přesunu z jedné elektrody na druhou. Vnitřní tlak elektrické povahy, způsobené obrovskou koncentrací nabitých částic podobného charakteru, je nutí natahovat v podélném směru. Tato tendence protahování spolu s tryskovou setrvačností a reologií má za následek divoký bičový boční pohyb.[20] V laboratorních podmínkách se electrospinning provádí za pomoci tyčky či trysky, ve větší výrobě pak především pomocí válečku smáčeném v polymerním roztoku. [21]



Obrázek 2: Schématické znázornění základního nastavení pro elektrostatické zvlákňování [22]

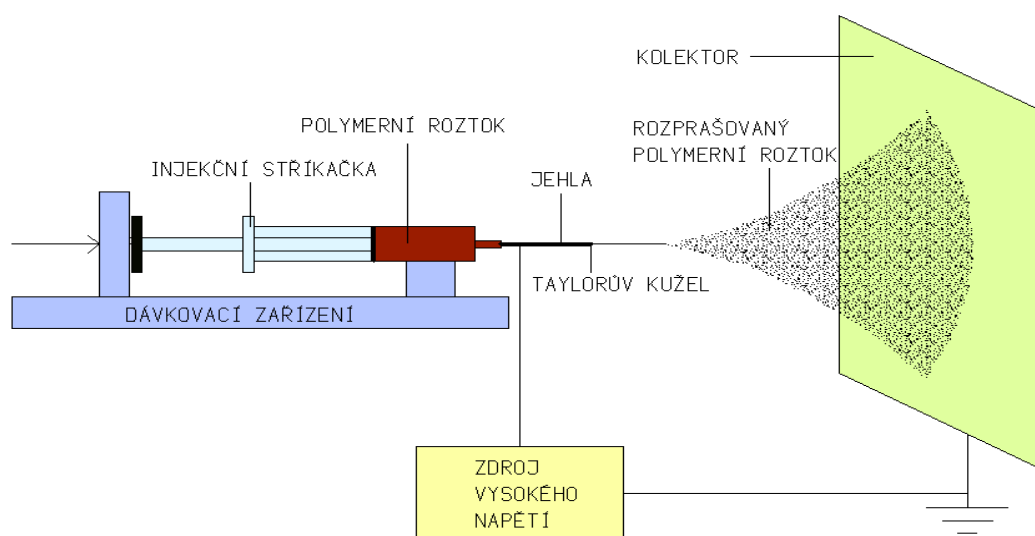
1.2.2 Elektrostatické rozprašování

Elektrostatické rozprašování je metoda odvozená od elektrostatického zvlákňování, ovšem neprodukuje nanovlákná, ale nanočástice. Zařízení jsou pro obě metody stejná, pouze záleží na parametrech polymeru a samotného procesu.

Principem rozprašování, stejně jako zvlákňování, jsou dvě protilehlé elektrody, mezi kterými je nezbytný rozdíl potenciálů. První elektrodu tvoří zařízení pro



rozprašování roztoku a druhou tzv. kolektor, na kterém zůstávají vytvořené částice. Rozprašování lze provádět z různých typů elektrod, podmínkou je však jejich vodivost. Jako elektrodu můžeme použít kapiláru, tyčku, váleček nebo strunu. Polymerní roztok je dávkován do kapiláry (jehla injekční stříkačky), kde na konci jehly po překonání kapilárních sil dochází k vzniku Taylorova kužele. Dle parametrů roztoku dochází k electrospinningu či electrosprayingu. V případě electrosprayingu je proud polymeru vlivem Rayleighovy nestability formován do tvaru velmi jemných kapek a na kolektor po odpaření rozpouštědla dopadají jemné částice. Pokud bude docházet k electrospinningu, vzniknou vlákna. Na obrázku 3 je znázorněno jehlové elektrostatické rozprašování. [21, 23]



Obrázek 3: Schéma electrosprayingu z jehly [24]

1.2.3 Parametry electrospinningu/electrosprayingu

Parametry polymerního roztoku

VISKOZITA

Viskozita roztoku je kritickým klíčem při určování morfologie vláken. Bylo prokázáno, že kontinuální hladká vlákna nemohou být získána z roztoku s velmi nízkou viskozitou, protože nesplňují požadavek na vhodnou viskozitu pro elektrostatické zvlákňování. [25, 26] Je důležité poznamenat, že viskozita,



koncentrace polymeru a polymerní molekulové hmotnosti jsou navzájem propojeny. [27]

KONCENTRACE

Koncentrace roztoku polymeru hrají důležitou roli při tvorbě vláken během procesu zvlákňování. Pro jednoduchost lze uvést 4 kritické koncentrace. Při nízké koncentraci dochází přednostně k elektrostatickému rozprašování micro/nanočástic. Pokud je koncentrace o něco vyšší, lze dosáhnout směsi vláken s částicemi. Při vhodné koncentraci vznikají kompaktní hladká vlákna. Při vysoké koncentraci polymeru bude docházet k vzniku šroubovicového mikropásu. [27]

MOLEKULOVÁ HMOTNOST

Molekulová hmotnost polymeru má rovněž významný vliv na morfologii vláken. V zásadě odráží zapletení polymerního řetězce v roztocích, zejména viskozitu roztoku. Nízká molekulová hmotnost polymeru předurčuje vznik částic, tudíž se uplatňuje především electrospraying. Pokud bude optimální molekulová hmotnost, dochází opět ke spinningu a vzniku hladkých vláken. Při použití vysokomolekulárního polymeru může docházet ke vzniku mikro-pásu. [27]

VODIVOST ROZTOKU

Bylo zjištěno, že zvýšení vodivosti roztoku (povrchová hustota náboje) má dopad na produkci jednotlivých vláken s menším počtem korálků a uzlů. Docílí se toho přidáním iontové soli do roztoku, např. NaCl, KH_2PO_4 . S pomocí iontové soli mohou být získána nanovlákna s malým průměrem. Vyšší vodivosti roztoku může být také dosaženo použitím organické kyseliny jako rozpouštědla. Například, Huang a kol. [28] použili kyselinu mravenčí jako rozpouštědlo k rozpuštění nylonu a získání ultratenkých (3 nm) elektrostaticky nylon-korálkových vláken. [27]

POVRCHOVÉ NAPĚTÍ

Elektrostaticky mohou být rozprašovány pouze polymerní roztoky s hodnotami povrchového napětí do 50 mN/m [29]. Proto se často přidává do rozpouštědla jiná látka snižující povrchové napětí. Pro polyvinylalkohol (PVA) se používá ethanol.



Parametry procesu

NAPĚTÍ

Přivedené napětí je rozhodujícím faktorem při elektrostatickém zvlákňování. K zvlákňování může docházet pouze při vyšším napětí, než je prahové, vzniká Taylorův kužel, ze kterého pak tryskají vlákna polymeru. [20] Na rozdíl od elektrostatického zvlákňování stačí při elektrostatickém rozprašování nižší hodnoty napětí. [30] Některé roztoky lze dobře rozprašovat už při hodnotách menších než 10 kV. Vysoké napětí má tendenci zvětšovat průměr částic, tvořit defekty, dokonce i vlákna. [20, 21] Někteří naopak zjistili, že s vyšším napětím roste pravděpodobnost vzniku kapslí. [31]

DÁVKOVÁNÍ

Obecně platí, že čím nižší průtok, tím jsou vyrobená vlákna hladší a tenčí. Vysoká hodnota průtoku obvykle generuje tlustší vlákna s korálky. [27]

KOLEKTOR

Kolektor slouží jako vodivý substrát pro sběr vláken/kapslí. Pro jednoduché experimenty se nejčastěji používá aluminiová folie, je ovšem obtížné získaná nanovlákna/nanokapsle přesunout na jiný substrát. S potřebou přenosu vyrobených vláken či kapslí byly vyvinuty další kolektory – drátěné pletivo, piny, rošty, rotující tyče, kolečka, atd. [27]

VZDÁLENOST JEHLY OD KOLEKTORU

Vzdálenost hrotu jehly od kolektoru má vliv na průměr a morfologii vlákna. Pokud je vzdálenost příliš krátká, vlákna nemají dostatek času na ztuhnutí, pokud bude naopak příliš dlouhá, vzniká nerovnoměrné vlákno s korálky. [27]

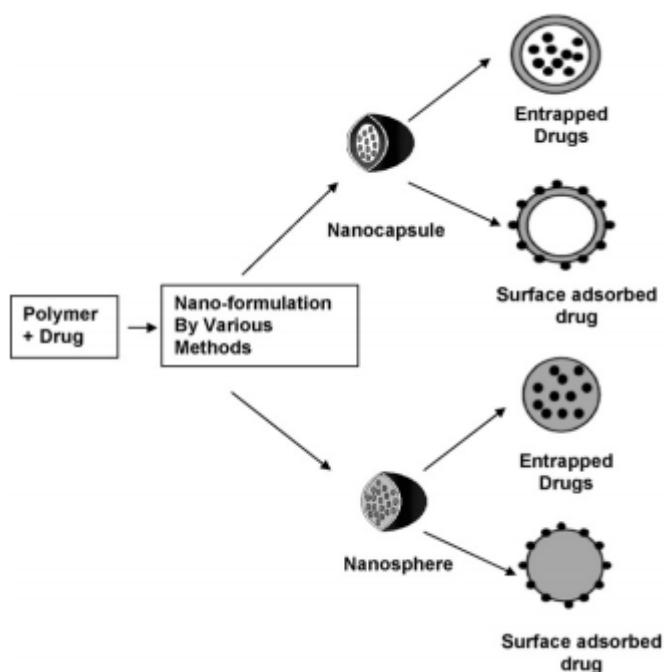
OKOLNÍ PODMÍNKY

Parametry vláken či kapslí mohou ovlivňovat okolní podmínky, jako jsou vlhkost a teplota. Při vyšší vlhkosti se vytvářejí silnější vlákna, při nižší dochází k vysušování rozpouštědla dříve, než je potřeba. Při zvýšení teploty lze dosahovat tenčích vláken. [27,32]



1.3 Drug delivery system

Systém cíleného dodávání léčiv a jejich řízený rozpad zaznamenal v posledních letech vysoký nárůst. Jedná se nejčastěji o biodegradabilní polymery funkcionalizované bioaktivními látkami, které umožňují lokální uvolňování aktivních látek, avšak nejsou jedinou možností. Použití se zaměřuje do medicinských oborů – převážně do oblastí léčby rakovinných nádorů, astmatu, hormonálních poruch a celkově do tkáňového inženýrství, kde zajišťuje požadovaný léčebný účinek. Nanočástice, které mohou sloužit jako nosný materiál léčiv, mohou být lipozomy¹, nanočástice na bázi pevných lipidů, dendrimerní² nanonosiče, křemenné, magnetické a uhlíkové nanočástice či již zmíněné polymerní nanočástice. Zde existují dva základní typy biodegradabilních nanočástic z polymeru – nanokapsle a nanosféry. Molekuly léčiv tak mohou být zachyceny uvnitř nebo naopak adsorbovány na povrchu kapsle, viz Obr. 5. [22, 33 - 35]



Obrázek 4: Typ biologicky rozložitelných nanočástic: Podle organizačního uspořádání biologicky odbouratelné nanočástice jsou klasifikovány jako nanokapsle, a nanosféra. [35]

¹ Lipozom - uměle vzniklá kulovitá struktura vytvořená z lipidové dvouvrstvy

² Denrimery - opakovaně rozvětvené molekuly



V dnešní době se výzkum především zaměřuje na dodávání léčiv proti rakovině (Suramin, Doxorubicin, Paclitaxel), antibiotikum (Rifampicin, Ampicillin), inhalační léky (Salbutamol, beclomethason dipropionát) a proteiny (především růstové faktory). Uvolňování léčiva závisí na jeho difuzi a na degradaci nosného materiálu. [33]

1.3.1 Kapsle a jejich charakteristika

Jedná se o kapsle s velikostí od několika nanometrů po desítky až stovky mikrometrů. Existují dva základní typy kapslí. První je homogenní distribuce aktivní látky v polymeru, druhým typem je kapsle, jejíž jádro je tvořeno aktivní látkou obalenou polymerním roztokem (Obr. 2). Druhá metoda se volí především v případě, kdy kapalný roztok léčiva není samostatně zvláknitelný nebo mísitelný s polymerním obalem. V takovém případě lze kapsle vyrábět metodou koaxiálního zvláknování, kdy jádro tvoří roztok léčiva a polymer představuje obal. [33]

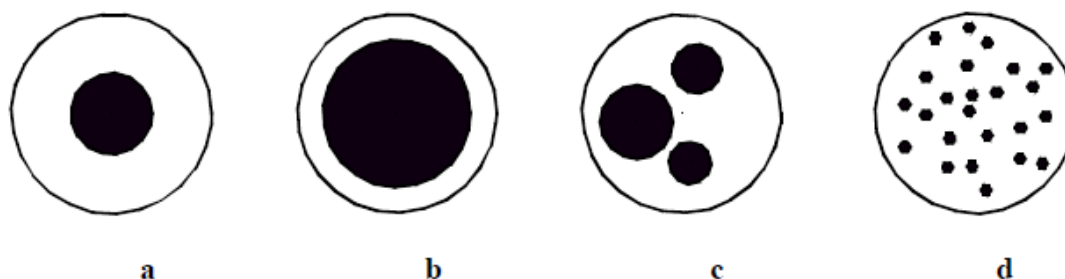
Charakteristika kapslí

Pro zjištění vlastností můžeme určit nosnost aktivní látky L , která udává procentuální poměr mezi hmotností aktivní látky uvnitř m_p a celkové hmotnosti částic m_c .

$$L = \frac{m_p}{m_c} \times 100\% \quad (1)$$

Další vlastností je účinnost zapouzdření E_z , která udává poměr mezi hmotností aktivní látky uvnitř kapsle m_p a celkovou hmotností látky použité k enkapsulaci m_m . [33]

$$E_z = \frac{m_p}{m_m} \times 100\% \quad (2)$$



Obrázek 5: Morfologické typy kapslí a, b - typ jádro/plášť, c - matricová kapsle, d - vícejaderný typ



1.3.2 Enkapsulace

Enkapsulací se rozumí zapouzdřování určité aktivní látky do polymerního obalu. Takto lze vyrobit nanokompozitní materiál, který obsahuje substanci, která je biologicky aktivní. Obalový materiál bývá velmi často degradovatelný. [36] V průběhu degradace se pak uvolňuje enkapsulovaná aktivní látka. Pod pojmem mikrokapsle či nanokapsle jsou označovány částice kulovitěho či jiného tvaru s velikostí od přibližně 50 nm do několika stovek mikrometrů. Na obrázku 2 jsou vyobrazeny různé idealizované typy kapslí, které umožňují uvolňování aktivní látky v potřebném časovém intervalu. Zatímco kapsle *a* a *b* uvolní veškerou aktivní látku najednou, kapsle *c* a *d* mohou uvolňovat látku postupně. Různými způsoby výroby kapslí lze tedy částečně ovlivňovat proces uvolňování dané aktivní látky. [36, 37]

METODY ENKAPSULACE

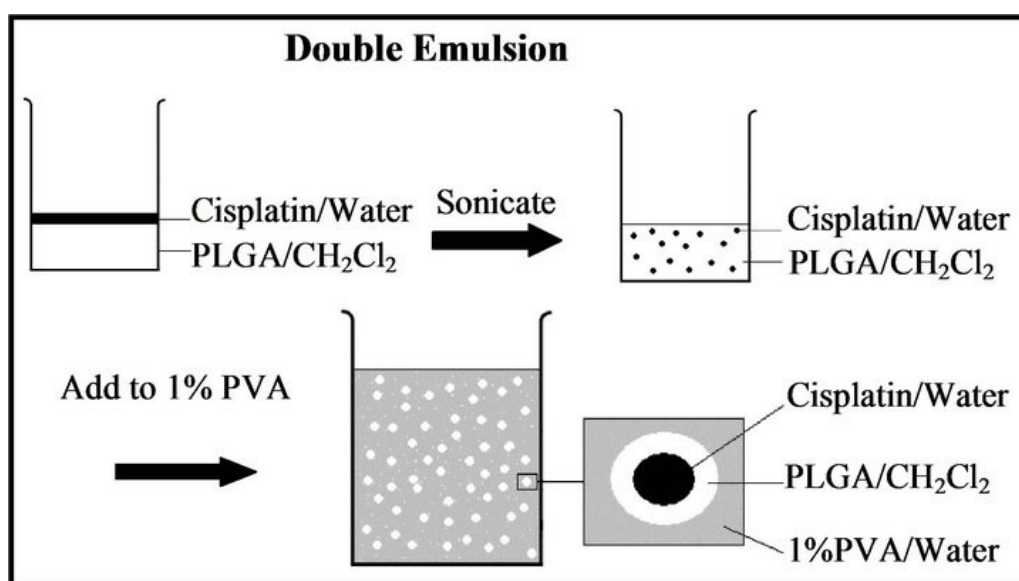
V dnešní době existuje mnoho metod výroby systémů pro cílené dodávání léčiv ve formě kapslí. Tyto technologie můžeme rozdělit do tří základních skupin, od kterých se dále odvozovaly ostatní. Jedná se o emulgaci založenou na odpařování rozpouštědla, fázovou separaci (koacervace) a sušení rozprašováním. Z odvozených metod to jsou například nanoprecipitace či mikro-fluidní technologie. Každá z těchto metod se vyznačuje svou vlastní výhodou i nevýhodou. [23, 38]

Metoda dvojité emulgate

Tato metoda je jednou z nejvíce používaných technologií pro výrobu kapslí. Při výrobě také záleží na mnoha parametrech – poměr organického rozpouštědla, typ povrchově aktivní látky, typ polymeru a molekulové hmotnosti. Vodný roztok aktivní látky se disperguje v organickém roztoku s rozpuštěnou polymerní látkou, kdy vzniká primární směs voda/olej (WO). Aktivní látky mohou být v kapalně formě (W) nebo v pevně fázi (P). Ve druhé fázi je primární směs rozptýlena do velkého objemu vody obsahující emulgátor za vzniku sekundární směsi WOW/POW. Kapsle se následně vytváří odpařením rozpouštědla nebo extrakcí.



Nevýhodou odpařování rozpouštědla je nutné použití vysoké teploty, často doprovázené snížením tlaku. Při extrakci se používá velké množství vody, což může být nevýhodou pro některé polymery. Tuto metodu je možné rozdělit na další podkategorie v závislosti na použitém fázovém rozhraní - voda-v-oleji-ve-vodě (W/O/W) (ve vodě rozptýlené olejové kapičky, které obsahují menší kapičky vodné) nebo olej-ve-vodě-v-oleji (O/W/O). Tato technologie je velice časově náročná, dochází k menší nosnosti a účinnosti zapouzdřených aktivních látek. Při odstraňování rozpouštědla také často dochází k difundování částic do vodného roztoku a k následné adsorpci na povrch kapslí. To pak znamená rychlé uvolnění velkého množství aktivní látky brzy po aplikaci. [39 - 41]

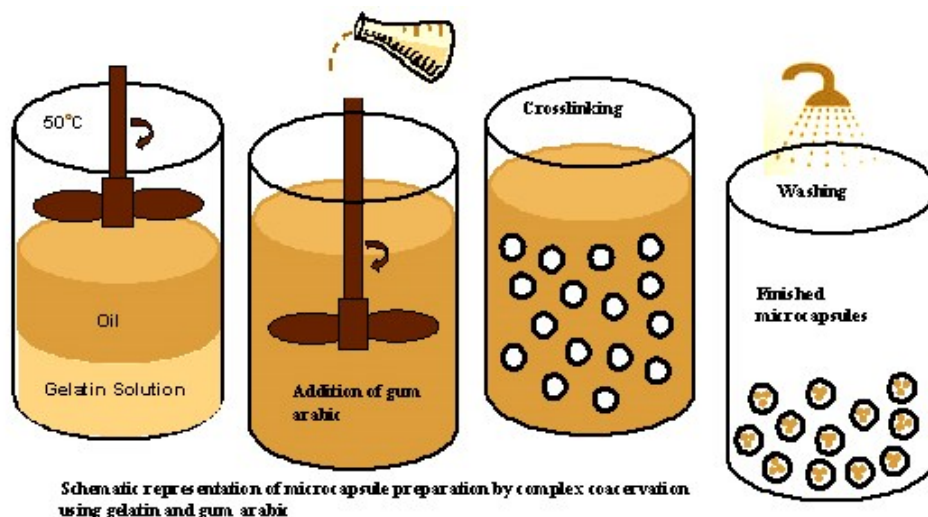


Obrázek 6: Schematické znázornění přípravy zapouzdřené cisplatin (chemoterapeutikum) pomocí metody dvojité emulgate [42]

Metoda koacervace

Koacervace popisuje fázovou separaci kapalně polymerně bohaté fáze z makromolekulárního roztoku, kdy se rozpustnost snižuje chemickým nebo fyzikálním způsobem. Tato metoda se podobá předchozí metodě, ovšem rozdíl nastává ve druhé fázi, kdy dochází k rozdělení na dva kroky. Nejprve se přidá primární směs do nerozpouštědla. Dochází k oddělení fází a k tvorbě koacervátových kapiček. Díky přidání vytvrzující látky se ve druhém kroku vytvoří kapsle. Nevýhodou této metody je možné uvolnění velkého množství aktivní látky v počáteční fázi dodání. [39, 43]





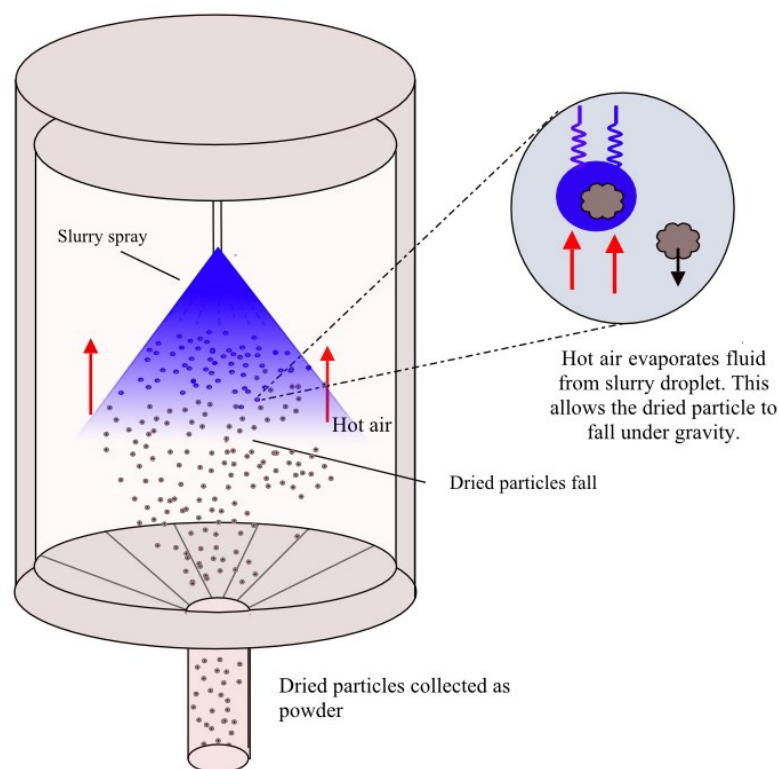
Obrázek 7: Schematické znázornění přípravy mikrokapslí komplexní koacervací pomocí želatiny a arabské gumy [44]

Metoda sušení rozprašováním

Při metodě sušení rozprašováním dochází k rozprašování roztoku s aktivní látkou do proudu teplého vzduchu, který zajišťuje odpaření rozpouštědla. Suché částice se následně ochladí na požadovanou teplotu. Výroba kapslí zahrnuje čtyři fáze: přípravu disperze nebo emulze, které mají být zpracovány, homogenizace disperze, atomizace roztoku a dehydratace rozprašených částic. [45]

Vlastnosti výsledných mikrokapslí jsou závislé na mnoha parametrech – charakter dávkování roztoku, průtoková rychlost a vstupní teplota. Výhodou této metody je snadné kontrolování průběhu výroby a jeho jednoduché změny. Nevýhodou jsou potřebná vysoká teplota a oddělování částic. Tato metoda je nejrozšířenějším průmyslovým postupem pro tvorbu částic a sušení. Je vhodný pro kontinuální výrobu suchých pevných látek v prášku nebo aglomerovaných částic vytvářených z kapalných surovin. [39, 45]





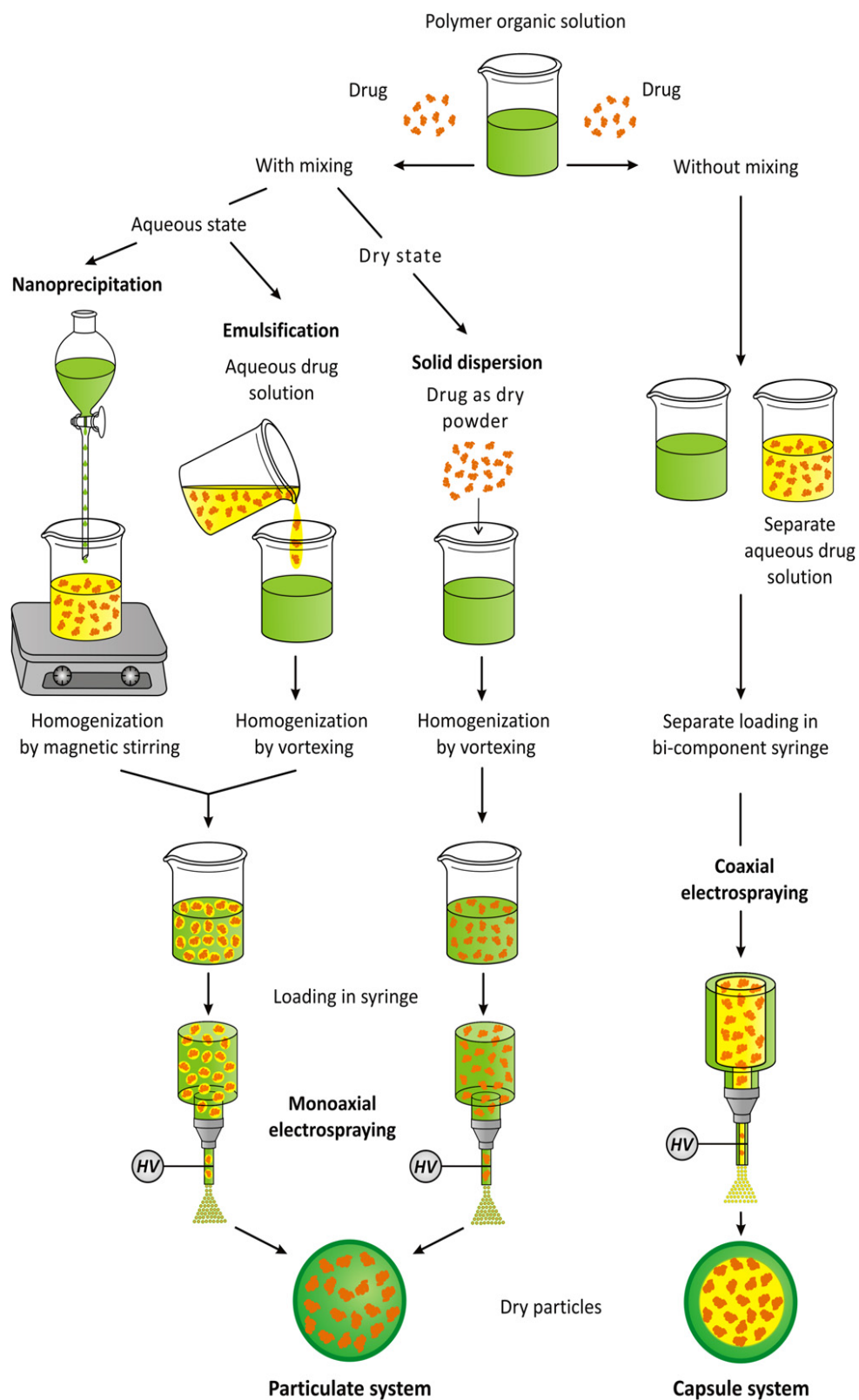
Obrázek 8: Schéma metody sušení rozprašováním [46]

Metoda elektrostatického rozprašování

Tato technologie se již dlouho uplatňuje v oblasti hmotnostní spektroskopie a inkoustového tisku, ovšem pro aplikaci v medicínských oborech jde ještě o poměrně novou metodu. Výhodou je především nevyužívání emulzních roztoků a začlenění aktivní látky do polymerního roztoku ještě před samotným rozprašováním. Zároveň není potřeba vysokých teplot, jako je tomu například u metody sušení rozprašováním. Lze také poměrně jednoduše kontrolovat velikost vytvářených částic. [33]

Elektrospraying má potenciál k omezení použití organických rozpouštědel, navíc je velmi univerzální, pokud jde o výběr polymerů, zařízení a aktivních látek. Je-li aktivní látka velmi citlivá na rozpouštědla (například enzymy, proteiny, DNA), lze využít koaxiálního rozprašování, kdy je nejprve vytvořeno jádro s aktivní látkou a následně obaleno polymerním obalem. [33, 47]





Obrázek 9: Různé metody zabudování aktivní látky do polymerních částic přes monoaxiální electro spraying (od vodné nanoprecipitace, emulgace a pevné disperze) pro výrobu systémů částic (LHS), a koaxiální electro spraying pro výrobu systémů kapslí (RHS) [33]



1.4 Biologicky aktivní látky

Biologicky aktivní látky jsou látky, které pozitivně či negativně ovlivňují biologický proces. Může se jednat o přírodní látky jako například med, mléko, okurky aj., ale i o chemické sloučeniny vyrobené uměle. Nejčastěji to jsou proteiny organického původu. Většinou obsahují aktivní enzymy, různé antioxidanty. Pro tuto práci jsou nejdůležitější proteiny a růstové faktory, které se vyskytují v trombocytech.

Tabulka 2: Některé důležité biologicky aktivní molekuly obsažené v PRP a jejich fyziologické role [48]

General category	Specific molecules	Physiological role
Adhesive proteins	Fibrinogen, fibronectin, vitronectin, thrombospondin-1, von Willebrand factor, laminin-8	Cell contact interactions, cellular adhesion, chemotaxis, ECM composition, clotting
Clotting factors and associated proteins	Factor V, factor XI, protein S, antithrombin, tissue factor pathway inhibitor	Thrombin activation and its regulation, eventual fibrin clot formation
Fibrinolytic factors and associated proteins	Plasminogen, plasminogen activator inhibitor, α -2 antiplasmin, thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor	Plasmin production and regulation
Proteases and anti-proteases	Tissue inhibitor of metalloproteases 1–4 (TIMP 1–4), MMP-1, -2, -4, -9, α -1 antitrypsin	Regulation of matrix degradation, regulation of cellular behavior, etc.
Growth factors, cytokines and chemokines	TGF- β , PDGF, insulin-like growth factor (IGF)-I and -II, FGF, EGF, VEGF, ECGF, KGF, GM-CSF, hepatocyte GF, TNF α , RANTES, IL-8, IL-1 β , BMP-2, -4, -6	Chemotaxis, cell proliferation and differentiation, promotion of ECM production, regulation of inflammation, angiogenesis
Antimicrobial proteins	Thrombocidins, kinocidins	Bactericidal and fungicidal properties
Membrane glycoproteins	α Ib β 3, α v β 3, CD-40 ligand, P-selectin, tissue factor, PECAM-1, CD63	Platelet aggregation and adhesion, inflammation, platelet–leukocyte interactions
Lipids	Sphingosine-1-phosphate, HETEs, thromboxane B ₂ , prostaglandin F ₂ α , leukotriene B ₄ , lipoxin A ₄	Inflammation modulation, cell migration and proliferation, etc.
Basic proteins and others	Platelet factor 4, β -thromboglobulin, endostatins, connective tissue activating peptide III, chondroitin-4 sulfate, albumin, immunoglobulins G and M	Regulation of endothelial cell chemotaxis and angiogenesis, vascular modeling, platelet activation, etc.

1.4.1 Proteiny

Bílkoviny (proteiny, polypeptidy) jsou organické makromolekulární látky polymerního charakteru a jedná se o jednu z makromolekulárních složek buněk. Bílkoviny se skládají ze specifických L-aminokyselin spojených peptidovou vazbou. V jednom řetězci bývá obsaženo nejméně 100 aminokyselin. [49] Aminoskupina jedné aminokyseliny je kovalentně spojena s karboxylovou skupinou další aminokyseliny. Libovolně dlouhý řetězec vzniká polykondenzací, konec řetězce s nezreagovanou aminoskupinou se označuje N-konec, naopak konec s volnou karboxylovou skupinou pak C-konec.

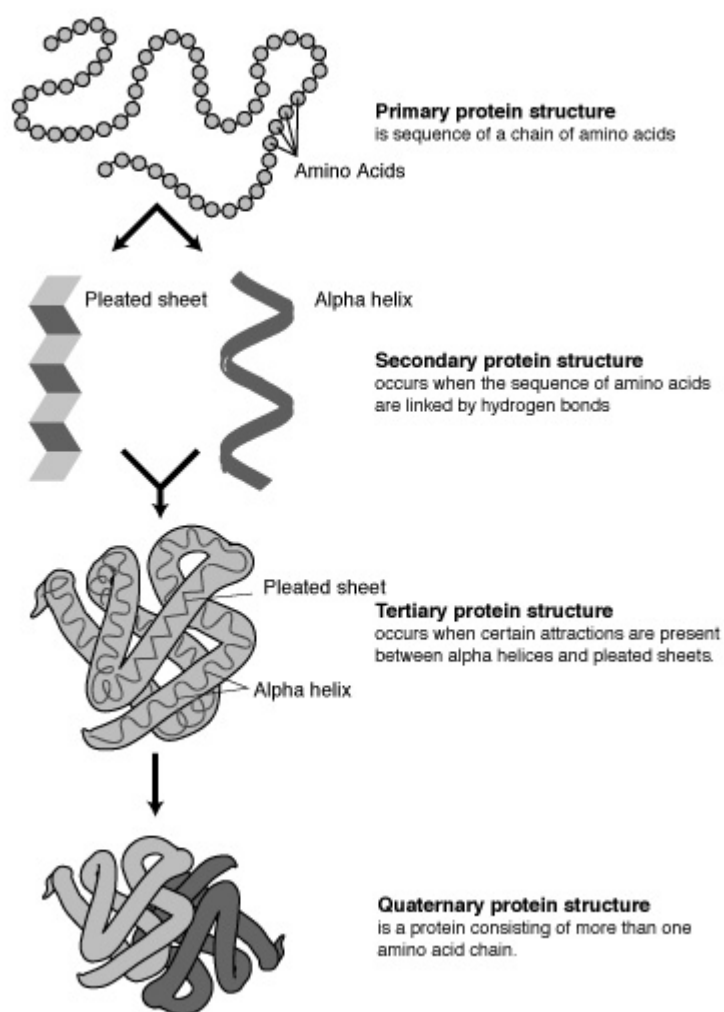


Struktura bílkovin

Struktura proteinů závisí na jednotlivém uspořádání aminokyselin a předurčuje jejich funkci. Struktura bílkovin se rozděluje na primární, sekundární, terciální a kvarterní.

Primární strukturou se rozumí sled aminokyselin v řetězci. Sekundární strukturou se rozumí prostorové uspořádání 2 aminokyselin v okolí a jejich stabilizace pomocí vodíkových můstků. Rozlišují se tři hlavní typy – α -helix (keratiny a svalové proteiny), β -list a β -ohyb. Terciální strukturou je prostorové uspořádání všech částí proteinu, kdy postranní řetězce i vzdálených aminokyselin vzájemně interagují. Mezi nedalekými aminokyselinami se vyskytují disulfidické můstky (cystein), kovalentní i nevazebné interakce. Existují dva typy terciální struktury – globulární a fibrilární struktury. Kvarterní struktura se rozlišuje u proteinů skládajících se ze dvou či více polypeptidových řetězců. Jedná se o spojení či propojení jednotlivých podjednotek proteinů. Příkladem bílkoviny mající kvartérní strukturu je například hemoglobin. [49, 50]





Obrázek 10: Struktura proteinů - 1 – primární struktura, 2 – sekundární struktura (β -list, α -helix), 3 – terciální struktura, 4 – kvarterní struktura [51]

1.4.2 Analýza proteinů

SDS-PAGE

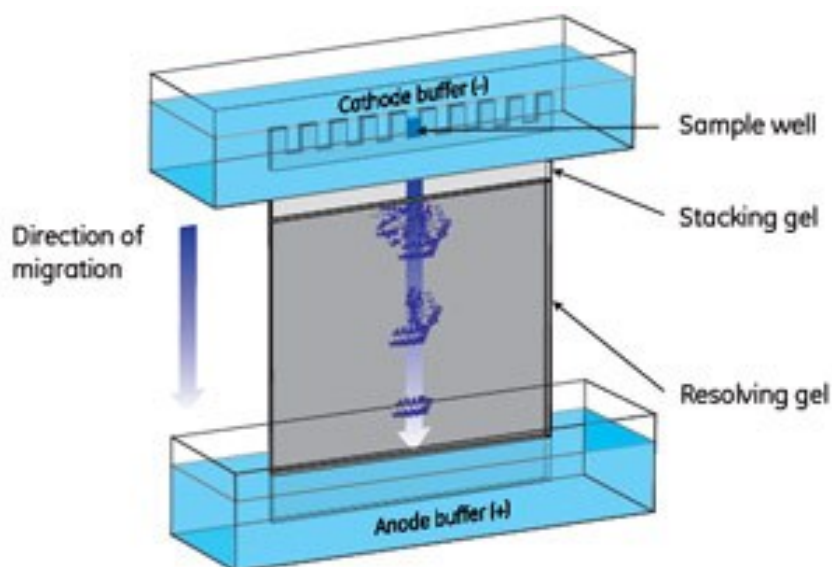
Elektroforetické metody jsou založeny na schopnosti pohybu elektricky nabitých molekul v elektrickém poli. U proteinů se nejčastěji využívá tzv. polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE). Polymerovaný gel se vloží mezi dvě nádoby naplněné pufrem, do kterých se ponoří elektrody. Vzorky se nanosou do jamek na horní straně gelu. Používají se alkalické pufrы, které proteinům dávají negativní náboj a v elektrickém poli se proto pohybují směrem ke kladně nabitě elektrodě - anodě. Při



použití nativních proteinů se využívá denaturační činidlo SDS (sodium dodecyl-sulfát), díky kterému pak lze proteiny separovat jen na základě jejich molekulové hmotnosti. Proteiny se denaturují rozpuštěním v roztoku, který obsahuje negativně nabitě molekuly SDS. Navíc se přidává redukční činidlo (β -merkapt ethanol), které dokáže narušit disulfidové vazby v bílkovinách. Následná denaturace se provádí varem.

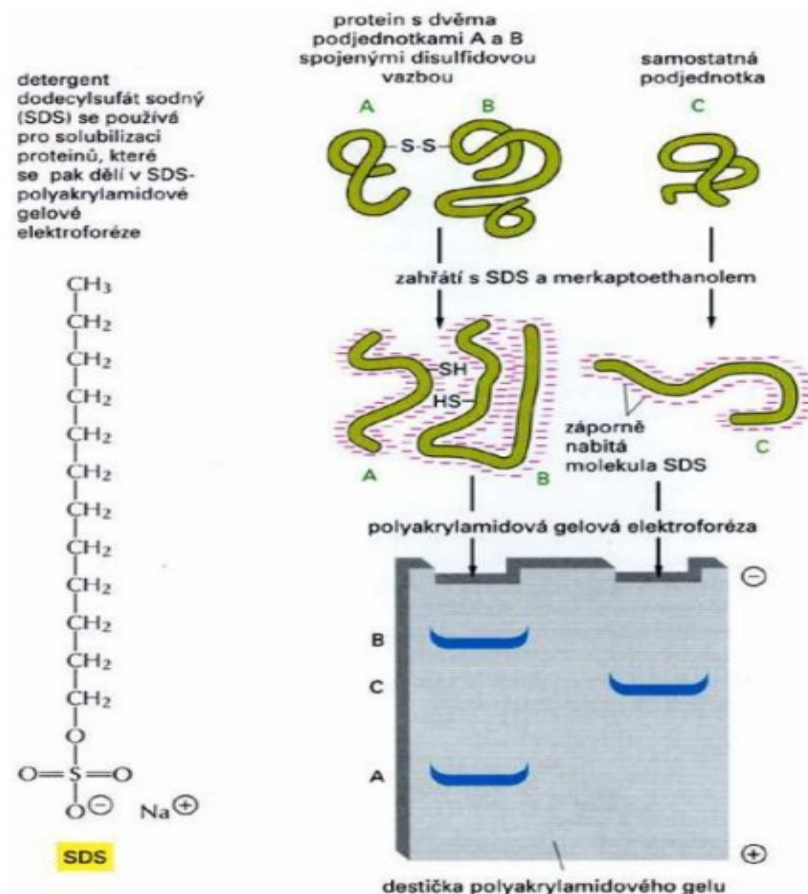
SDS se váže na proteiny a jeho vlastní negativní náboj zamaskuje náboj proteinu. Přispívá taktéž k denaturaci proteinu, čímž eliminuje vliv tvaru proteinu na jeho pohyblivost. Počet molekul SDS navázaných na protein je zhruba úměrný jeho molekulové hmotnosti, proto každý protein má bez ohledu na svou velikost také ekvivalentní hustotu náboje. Jediný faktor, na základě kterého se proteiny následně v gelu liší svojí pohyblivostí, je jejich molekulová hmotnost.

Pro zviditelnění jednotlivých proteinů se používají nespecifická barviva jako například stříbro či *Coomassie Brilliant* modř. V případě analýzy většího množství proteinů je lepší využít specifické imunochemické analýzy (Western blott). [52, 53]



Obrázek 11: Základní schéma SDS PAGE elektroforézy [54]





Obrázek 12: Vzorec a princip SDS-PAGE [55]

Určení koncentrace proteinu

METODA PODLE BRADFORDOVÉ

Tato metoda využívá vazby barviva *Coomassie Blue Brilliant G 250* (CBBG) na proteiny. Barvivo CBBG se váže na molekuly proteinu v kyselém prostředí dvěma způsoby. Trifenylmethanová skupina se váže na nepolární části proteinu a zároveň anion sulfoskupiny na bazické skupiny, které jsou na vedlejších řetězcích aminokyselin, jako jsou arginin a lysin. Po vazbě barviva na proteiny dochází k barevné změně, která je přímo úměrná množství proteinu. Standardně se smíchá 20 μ l vzorku se 180 μ l činidla Bradfordové na mikrotitrační destičce a nechá se 5 minut inkubovat. Poté se změří absorbance při vlnové délce $\lambda = 595$ nm. Reakce je vysoce citlivá u albuminu a u mnoha globulárních proteinů. Jako kalibrace se právě proto používá hovězí sérový albumin (BSA). Nevýhodou této metody je velké množství interferujících látek, které jsou známy. Metoda je jednoduchá a citlivá,



proto je často používána. Tato metoda je třikrát až čtyřikrát citlivější než Lowryho metoda a BCA metoda. [53, 56, 57]

BICINCHONINOVÁ METODA (BCA METODA)

Metoda využívající kyselinu bicinchoninovou (BCA) ke spektrofotometrickému stanovení celkových proteinů. Její princip je založen na alkalické redukci měďnatého iontu proteinem a následné chelataci měďnatého iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku červeného zbarvení. BCA metoda je velmi citlivá na podmínky provedení – na době a teplotě inkubace, na charakteru proteinu použitého ke standardizaci. [53, 58, 59]

BIURETOVÁ METODA

Jedná se o metodu založenou na interakci proteinů s ionty mědi, konkrétně na chelataci měďnatého iontu imidovými strukturami bílkoviny, které jsou ionizované v silně alkalickém prostředí za vzniku červeného komplexu. V tomto stanovení interferuje glukosa a jiné měď redukující látky (sulfhydrylové skupiny proteinů – keratin, vysoké koncentrace amonných solí, některé fosfáty používané při purifikaci proteinů). Tato metoda je vhodná pro vzorky obsahující 1 až 10 mg proteinu na mililitr. Většina proteinů poskytuje tmavě červené zbarvení s maximem absorpce při vlnové délce $\lambda_{\max} = 550 \text{ nm}$. [55, 58]

LOWRYHO METODA

Nejčastěji citovaná fotometrická metoda je vylepšením biuretové metody přidáním Folin-Ciocalteu (wolframan molybdenan) činidla pro zlepšení jeho citlivosti. Chemické mechanismy, které vedou ke vzniku zbarvení, nejsou zcela známy. Vyskytují se ve 2 krocích. V prvním kroku reaguje alkalická směs měďnatých iontů a vinanu sodno-draselného (Lowryho činidlo) s proteiny za vzniku Cu^{2+} koordinačního komplexu (Biuretová reakce). Za druhý krok je považována redoxní reakce, během níž dochází k přesunu elektronů na wolframan-molybdenan v Folin-Ciocalteu fenolovém činidlu, což vede k barevnému produktu, který absorbuje světlo při 750 nm. Elektrony mohou vznikat v Cu^{2+} koordinačního komplexu, ve zbytcích tryptofanu a tyrosinu nebo v jiných redukčních činidlech v reakční směsi.



Tímto způsobem proteiny i tyrosinové a tryptofanové zbytky přispívají k tvorbě barev. Je známo mnoho interagujících látek, které zkreslují výsledky. Patří mezi ně volné aminokyseliny, lipidy a mastné kyseliny, rostlinné pigmenty, redukční činidla, včetně redukujících cukrů, volné thiole, polysacharidy, nukleové kyseliny, fenoly, Fe^{2+} , oxid siřičitý a siřičitany. Počet možných rušivých a Lowry-reaktivních sloučenin naznačuje, že tato metoda může být falešně pozitivní ve větší míře, než je metoda biuretu. [58, 60] Modifikovaný Lowry má lineární rozsah od $\sim 200 \mu\text{g/ml}$ až $4000 \mu\text{g/ml}$ za použití poměru činidla ke vzorku 5: 1. [61]

STANOVENÍ Z UV SPEKTRA

Proteiny, které obsahují vedlejší řetězce tyrosinu a tryptofanu, absorbují světlo v UV oblasti spektra při 275 – 280 nm. Při vhodném naředění vzorku je možné takto stanovit celkový obsah proteinů z hodnoty absorbance v této oblasti. Metoda je citlivá pro stanovení čistých proteinů v koncentračním rozsahu 0,1 – 1 mg/ml. Molární absorpční koeficient je znám u mnoha čistých proteinů, proto lze poměrně přesně stanovit jejich molární koncentraci. [53]

1.4.3 Růstové faktory

Růstové faktory (RF, GF - Growth factors) jsou specifické bílkovinné induktory³ buněčné proliferace. V lidském těle se uplatňují v průběhu ontogeneze, ale taktéž v dospělosti, zejména při reparaci a regeneraci pojivových tkání. Terapeutickým využitím těchto proteinů se od 90. let 20. století zabývá několik světových center. První klinicky verifikované aplikace RF byly nejprve v oblasti orofaciální chirurgie⁴, nyní postupně pronikají aplikace RF do většiny chirurgických oborů medicíny.

Růstové faktory jsou proteiny syntetizované rozsáhlou skupinou buněk mezenchymálního původu. Specificky se váží na receptory buněčných membrán a indukují buněčnou proliferaci a/nebo diferenciaci. Některé RF dokáží stimulovat množství odlišných buněčných typů, jiné jsou přísně specifické. V procesech regenerace pojivových tkání se nejvíce uplatňují polypeptidy, které jsou syntetizované magakaryocyty – Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor β -1 (TGF β -1), Epidermal Growth Factor (EGF), Vascular Endothelial Growth Factor VEGF). V inaktivní formě jsou obsažené

³ Induktory - vyvolávače

⁴ Orofaciální chirurgie - oblast chirurgie zabývající se oblastí úst a obličeje



v granulích trombocytů, ze kterých jsou uvolňovány např. působením trombinu při hemostáze⁵. Rychlost a rozsah proliferace buněk je přímo úměrná množství aktivních růstových faktorů. [62]

Růstové faktory nepodporují pouze buněčnou diferenciaci a proliferaci, ale také mnoho dalších procesů jako například chemotaxi a další procesy pro regeneraci tkání.

PRP (platelet-rich plasma, plasma bohatá na trombocyty) je koncentrovaný roztok krevních destiček. Aplikované růstové faktory v organismu výrazně urychlují proces reparace a regenerace, zároveň také silně redukuje zánět a tkáň se hojí bez výrazných otoků. Tento efekt je ovlivněn právě vysokým množstvím růstových faktorů obsažených v PRP. Trombocyty mohou být také v umělém roztoku – např. tzv. composolu, obsahující především glukózu a sodné a draselné soli, takovéto roztoky jsou označovány jako TRS (Trombocyte-Rich solution).

Tabulka 3: Nejdůležitější trombocytární růstové faktory v PRP a jejich molekulové hmotnosti [63, 64]

Zkratka	Název	Funkce	Molekulová hmotnost
TGFB1	Transformující růstový faktor beta-I	Ovládá prvky proliferace, diferenciaci a jiné funkce v mnoha typech buněk	44,341 kDa
PDGFA	Destičkový růstový faktor, alfa polypeptid	Silný mitogen pro buňky pojivové tkáně a exerts funkce interakcí se souvisejícími receptory tyrosinkinázami	24,043 kDa
PDGFB	Destičkový růstový faktor, beta polypeptid	Podporuje proliferaci buněk a inhibuje apoptózu	27,283 kDa
PDGFC	Destičkový růstový faktor C	Zvyšuje motilitu v mezenchymálních buňkách fibroblastů, buněk hladkého svalstva, kapilárních endoteliálních buněk a neuronů	39,029 kDa
PDGFD	Destičkový růstový faktor D	Podílí se na vývojových a fyziologických procesech,	42,842 kDa

⁵ Hemostáza – zástava krvácení



Zkratka	Název	Funkce	Molekulová hmotnost
		stejně jako u rakoviny, fibrotických onemocnění a arteriosklerózy	
IGF1	Inzulinu podobný růstový faktor I	Zprostředkovává mnoho vlivů růstového hormonu	21,841 kDa
EGF	Epidermální růstový faktor	Indukuje diferenciaci specifických buněk, je silný mitogenní faktor pro různé typy kultivovaných buněk, jak ektodermálního původu, tak mesodermálního	14,460 kDa
FGF1	Fibroblastový růstový faktor I	Navozuje genové exprese jádra, angiogeneze a proliferaci fibroblastů	133,994 kDa
VEGFA	Vaskulární endoteliální růstový faktor A	Mitogenem primárně pro vaskulární endoteliální buňky, indukuje angiogenezi	27,014 kDa
VEGFB	Vaskulární endoteliální růstový faktor B	Regulátor fyziologie krevních cév, s rolí v endotelovém cílení lipidů do periferních tkání	21,602 kDa
VEGFC	Vaskulární endoteliální růstový faktor C	Angiogeneze a růst endoteliálních buněk, a může také mít vliv na propustnost cév	46,883 kDa

1.4.4 Trombocyty

Trombocyty nebo-li krevní destičky, někdy označované zkratkou PLT (z anglického platelet) jsou spolu s erytrocyty (červené krvinky), leukocyty (bílé krvinky) a krevní plasmou součástí krve savců. Trombocyty jsou bezjaderná diskoidní tělíska, mají nepravidelný tvar a jsou to nejmenší částice v krvi. Vyskytují se v různých velikostech, tvarech i hustotě. Tvar trombocytů se mění dle stupně aktivace. [65]

Trombocyty zastávají v organismu tři hlavní funkce – zástavu krvácení, vliv na správnou funkci endotelu a hojivé procesy. Trombocyty podléhají řadě interakcí – se



složkami plazmy či narušeným povrchem endotelu, výsledkem je pak aktivace trombocytu. [66]

Proces aktivace:

Aktivace trombocytu → Metabolické a morfologické změny →

→ Adheze k jiným než destičkovým povrchům →

→ Agregace (vzájemné shlukování trombocytů) → sekrece (i RF)

→ Retrakce (smršťování agregovaných trombocytů)

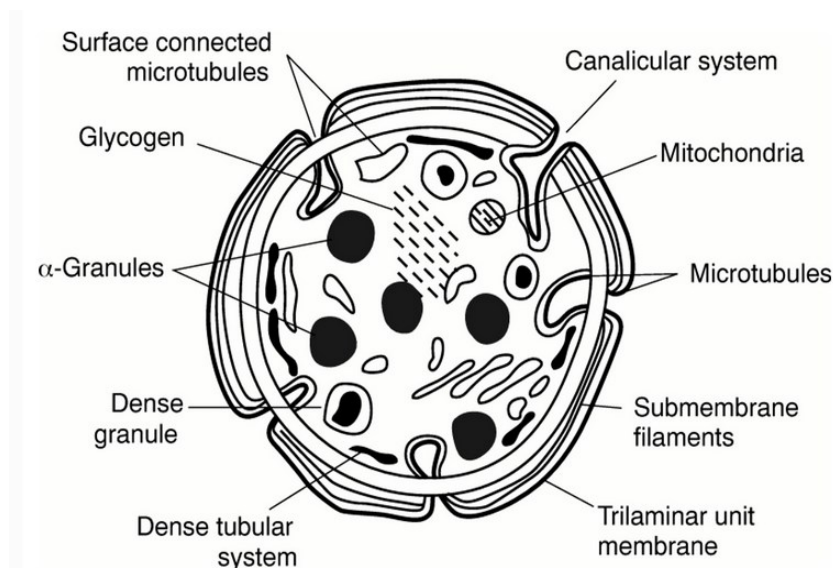
Strukturu trombocytu lze rozdělit do 3 oblastí: periferní oblastí, oblastí solubilního gelu a oblastí organel. V periferní oblasti se nachází plasmatický obal, glykokalyx (ochranný plášť povrchu krevní destičky tvořený převážně glykoproteiny a proteoglykany), membránové a submembránové struktury, které zajišťují interakci s mimobuněčným prostředím. Oblast solubilního gelu se skládá z pásu mikrotubulů, submembránových filament a mikrofilament, což jsou základní jednotky kontraktilního systému trombocytů). Uprostřed krevní destičky se nachází oblast organel - granulomera, což je shluk acidofilních granul a občas i mitochondrie. [65, 66]

Granulomera dále obsahuje 3 typy granul⁶:

- Alfa – obsahuje transformující růstový faktor- β 1, destičkový faktor 4, destičkový růstový faktor, Von Willebrandův faktor, β -tromboglobulin, fibrinogen, koagulační faktory V a XIII, aj.
- Delta (denzní) - obsahuje serotonin, vápenaté ionty, pyrofosfát, ATP, ADP
- Lambda (lysosomy) - obsahuje lysosomální enzymy

⁶ Granula – strukturně malé částice, obvykle označovaná jako sekreční váček





Obrázek 13: Schéma složení trombocytu [67]

Trombocytární přípravky

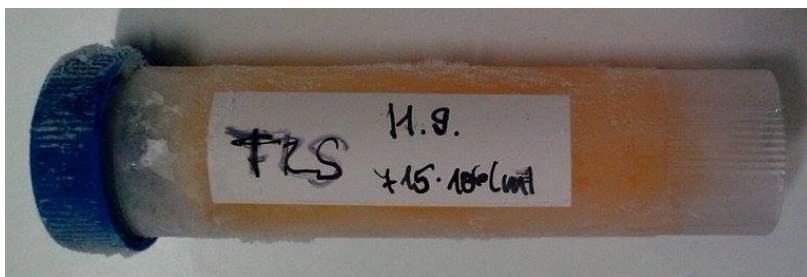
Trombocytární přípravky (TP) se dělí dle způsobu výroby na:

- a. Trombocyty z aferézy (TA)
- b. Trombocyty z odběru plné krve z buffy coatu (TB)

Díky vysokému množství růstových faktorů představují trombocyty významný potenciál pro regenerativní medicínu. Uvolněné růstové faktory podporují v organismu buněčnou diferenciaci, proliferaci, transkripci specifických proteinů, chemotaxi a další procesy nutné pro regeneraci tkání. *In vitro* se trombocyty ve formě PRP (platelet-rich plasma) využívají pro stimulaci buněčné proliferace různých typů tkáňových kultur. [66, 68]

Expirace trombocytárních přípravků je velmi krátká (5 dní), proto je vhodné je pro výzkumné účely zamrazovat a zpracovávat na lyzáty, lyofilizáty aj.





Obrázek 14: TRS z 11. 9. 2014 s koncentrací trombocytů $715 \times 10^6/\text{ml}$ z transfuzního oddělení KNL

Trombocyty z odběru plné krve z buffy coatu

Výroba trombocytárního přípravku zahrnuje několik fází (kroků). Nejprve se provede odběr plné krve od dárce, který měl v pořádku krevní obraz a krevní vyšetření na infekční nemoci. Krev se odebírá do označeného vaku s antikoagulačními látkami. Poté se nechá krev minimálně 2 hodiny odpočinout. Následuje stočení vaku v centrifuze při určitých podmínkách zpracování. Pak dochází k separaci jednotlivých složek. Prostřední frakce je tzv. „Buffy coat“ obsahující trombocyty, část plasmy, červených a bílých krvinek. Přes noc se buffy coat nechává míchat v tromboagitátoru a druhý den přichází na řadu mísení 4 vaků s composolem (pufr obsahující sodné, draselné a hořečnaté soli, glukonát sodný a další). Nakonec se vaky ještě propláchnou composolem a opět se zcentrifuguje obsah vaku pro další separaci. Na automatickém lisu se oddělí trombocyty od červených krvinek a filtrem se zachycují bílé krvinky, takže dochází k tzv. deleukotizaci.

Příprava trombocytárního lyzátu

Existuje mnoho metod přípravy PL. Základním principem je zamrazení a rozmrazení trombocytárního přípravku a jeho následné centrifugaci. Jednotlivé postupy se liší teplotami rozmrazení, počty cyklů zamrazení a rychlostí centrifugace. Tři cykly zamrazení používají zde [69, 70], minimálně 2 cykly se používají i [71]. Trombocytární přípravky se rozmrazují při teplotě 37°C podle [69, 70], ovšem podle [71] je šetrnější rozmrazovat při teplotě 5°C . Zamrazení se nejvíce provádí při -80°C [69, 71] nebo se provádí zamrazení dusíkem na teplotu -196°C [70]. Podle [69] se centrifuguje při $900 \times g$ po dobu 30 minut při pokojové teplotě, [71] uvádí naopak při $4000 \times g$ po dobu 30 minut při teplotě 10°C , dle [70] stačí $1400 \times g$ po dobu 10 minut. Liší se také teplota skladování od -80°C [69] do -20°C [70, 71].



2 Experimentální část – optimalizace výroby nanokapslí a studium enkapsulace

2.1 Materiály a metody

2.1.1 Použité chemikálie

V následující tabulce jsou vypsaný všechny chemikálie, které jsou potřeba pro tuto práci.

Tabulka 4: Použité chemikálie

Chemikálie	Výrobce	Poznámka
30% akryl-bisakrylamid mix	Amresco, USA	
APS – persulfát amonný	Lach: Ner, Neratovice	Amonium persulphate
Bromfenolová modř	Amresco, USA	
BSA – hovězí sérový albumin	VWR International, USA	
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma Aldrich, USA	Metoda podle Bradfordové
Coomassie Brilliant Blue R-250	Roth, Německo	SDS-PAGE
Ethanol 96,8%	Penta s.r.o., Praha	
Glycerol	Roth, Německo	
Glycin	VWR International, USA	
Chloroform 99,8%	Penta s.r.o., Praha	
Kyselina fosforečná	Penta s.r.o., Praha	
Kyselina chlorovodíková	Penta s.r.o., Praha	
Kyselina octová	Penta s.r.o., Praha	
Methanol	Penta s.r.o., Praha	
Protein MW Marker, Wide Range K494	Amresco, USA	Proteinový marker pro elektroforézu



Chemikálie	Výrobce	Poznámka
PVA Mowiol 3-98 18.000MW	Kuraray Co., Ltd, Japonsko	
PVA 16% Sloviol R	Novácke chemické závody, Slovensko	
SDS – dodecylsírán sodný	Sigma Aldrich, USA	Sodium dodecyl sulphate
TRIS	Amresco, USA	Tris(hydroxymethyl)amino- methan
B-merkapt ethanol	Roth, Německo	
Composol	Fresenius Kabi AG- 61346 Bad Homburg, Německo	Náhradný roztok pro trombocytární přípravky, složení viz Příloha A

2.1.2 Vytvořené roztoky

Pro práci bylo potřeba připravit roztoky pro SDS-PAGE. Roztoky byly připraveny podle návodu firmy Roche [72]. Jednotlivé roztoky sloužily pro přípravu polyakrylamidových separačních gelů. Podle předpokládaného výsledku se vybere vhodná koncentrace akrylamidu v gelu (Obr 15). Pro lyzáty se jeví nejvhodnější 8% - 12% gel. Přesné složení jednotlivých gelů je popsáno v (Příloha B). Dále bylo zapotřebí připravit roztoky pro kvantitativní analýzu proteinu podle Bradfordové. Jednotlivé roztoky jsou popsány v následující tabulce:

Tabulka 5: Složení jednotlivých roztoků [57, 72]

Metoda	Roztok	Složení	Poznámka
SDS-PAGE	10% SDS	10 g SDS 90 ml destilovaná voda (dH ₂ O)	Objem doplněn dH ₂ O do 100 ml, skladování při pokoj. teplotě
	1,5 M Tris-HCl pH 6,8	9,09 g Tris 40 ml dH ₂ O pH upraveno HCl	Objem doplněn dH ₂ O do 50 ml, pokoj. teplota



Metoda	Roztok	Složení	Poznámka
	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	18,7 h Tris 80 ml dH ₂ O pH upraveno HCl	Objem doplněn dH ₂ O do 100 ml, pokoj. teplota
	10% amonium persulfát	1 g APS 8 ml dH ₂ O	Objem doplněn dH ₂ O do 10 ml, zamražen na -20°C
	2x SDS-PAGE vzorkový pufr	10 ml Tris-HCl pH 6,8 12 ml 10% SDS 30 ml glycerol 15 ml β-merkapt ethanol 1,8 mg bromfenolová modř	Sample buffer, objem doplněn dH ₂ O do 100 ml, zamražen na -20°C
	8% polyakrylamidový rozdělovací gel	4,6 ml dH ₂ O 2,7 ml 30% akryl- bisakrylamid mix 2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8) 0,1 ml 10% SDS 0,1 ml 10% APS 0,006 ml TEMED	10 ml / 1 gel (Příloha B)
	12% polyakrylamidový rozdělovací gel	3,3 ml dH ₂ O 4,0 ml 30% akryl- bisakrylamid mix 2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8) 0,1 ml 10% SDS 0,1 ml 10% APS 0,006 ml TEMED	10 ml / 1 gel (Příloha B)
	5% Zaostrovací gel	2,7 ml dH ₂ O 0,67 ml 30% akryl- bisakrylamid mix 0,5 ml 1,5M Tris (pH 6,8) 0,04 ml 10% SDS	4 ml / 1 gel (příloha B)



Metoda	Roztok	Složení	Poznámka
		0,04 ml 10% APS 0,004 ml TEMED	
	10x SDS-PAGE pufr	800 ml dH ₂ O 10 g SDS 30,3 g Tris 144,1 g glycín	Running buffer, objem doplněn dH ₂ O do 1000 ml, pokojová teplota
	CBB barvicí roztok	450 ml methanol 100 ml kyselina octová 400 ml dH ₂ O 2,5 g CBBR	Staining solution, objem doplněn dH ₂ O do 1000 ml, pokojová teplota
	CBB odbarvovací roztok	450 ml methanol 100 ml kyselina octová 400 ml dH ₂ O	Destaining solution, objem doplněn dH ₂ O do 1000 ml, pokojová teplota
	Sušicí roztok	450 ml methanol 100 ml kyselina octová 30 ml glycerol 370 ml dH ₂ O	Objem doplněn dH ₂ O do 1000 ml, pokojová teplota
Metoda podle Bradfordové	Činidlo Bradfordové	10 mg CBBG 5 ml ethanol 10 ml kyselina fosforečná	Objem doplněn dH ₂ O do 100 ml., teplota 4°C
	Standart BSA	1 mg BSA 90 ml dH ₂ O	Objem doplněn dH ₂ O do 100 ml, zamražen na - 20°C

2.1.3 Použitá laboratorní zařízení, přístrojová technika

Všechna zařízení, která byla použita, jsou přehledně vypsána v následující tabulce 6:



Tabulka 6: Seznam přístrojů

Přístroj	Výrobce	Poznámka
Rastrovací elektronový mikroskop Vega 3 SB	Tescan Brno s.r.o	Energiově disperzní prvkový mikroanalýzátor (EDX)
Obrazový analyzátor NIS-Elements AR 3.2	Nikon Instruments	Software
ELx808 Absorbance Microplate Reader	Biotek	Spektrofotometr, GEN5 Data analysis software
pH metr pH700	Eutech Instruments	
SDS-PAGE elektroforéza	VWR International	Vertikální elektroforéza
Enduro Power Supplies 300V	Labnet	Zdroj napětí
Centrifuga Z36HK	HERMLE Labortechnik GmbH	
Vodní lázeň LCB-6D	Labtech International Ltd, UK	
Quorum Q150ES	Quorum Technologies Ltd, UK	Zlatička
Hlubokomrazicí box MDF-033V	SANYO Electric Co., Ltd., Japan	-80°C
Centrifuge 5415C	Gerätebau Eppendorf, Německo	Centrifuga pro mikrozkušky
Termoblok BBA	Grant BOEKEL	
Lineární pumpa KDS 100	KD Scientific, USA	Dávkovací zařízení
Zdroj vysokého napětí SL 150	Spellman, USA	
Zdroj vysokého napětí ER50P6	Glassman High Voltage Inc.	

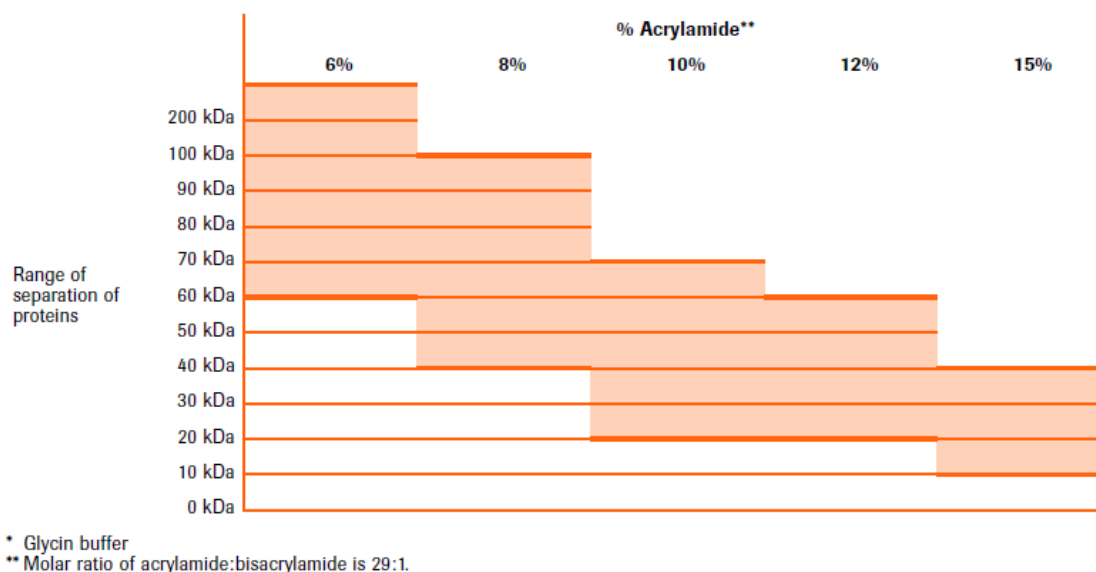


SDS – PAGE elektroforéza

V práci byla použita vertikální SDS-PAGE elektroforéza od firmy VWR International se zdrojem Enduro Power Supplies 300V od firmy Labnet.

Nosičem je polyakrylamidový gel, ve většině experimentů byl 8%, v prvních pokusech byl připraven i 12%. Každá koncentrace přesněji detekuje určité rozmezí molárních hmotností proteinů, viz Obr 16. Každý gel byl připraven z roztoků 10% SDS, destilované vody, Tris-HCl pH 8,8, 30% mix akryl-bisakrylamidu, 10% ammonium persulfátu a TEMED. Množství jednotlivých chemikálií se lišilo dle koncentrace gelu a dle množství připravovaného gelu, viz tabulka v Příloze B. Vše se smíchalo, naposledy se přidával ammonium persulfát a TEMED. Hned se roztok pipetuje mezi sklíčka do výšky cca 2 cm od horního okraje, převrství se destilovanou vodou a nechá se ztuhnout 45 minut. Poté se destilovaná voda odstraní a připraví se zaostřovací gel téměř stejného složení až na roztok Tris-HCl o pH 6,8. Jednotlivá množství roztoků jsou uvedena v tabulce. Mezi sklíčka se pak tento roztok napipetuje a vloží se tam hřeben, který vytvoří v gelu jamky pro vzorky, nechá se opět 40 minut ztuhnout. Následně se hřeben odstraní, celá elektroforéza se vloží do elektroforetické vany, přidá se roztok SDS, promyjí se jamky vytvořené v gelu a pomocí loudovacích špiček se napipetuje vzorek a marker do jamek. Nejprve elektroforéza probíhá při napětí 70 V v oblasti zaostřovacího gelu, když čelo elektroforézy projde tímto gelem, lze napětí zvýšit na 120 V. Čelo elektroforézy by se nemělo dostat mimo gel ve sklíčku, je tedy vhodné ji ukončit pár milimetrů před hranou skla. Po proběhnutí elektroforézy (cca 2 až 2,5 hodiny) se gel vyjme ze sklíček, odřízne zaostřovací gel a vloží do roztoku CBB barvicího roztoku (staining solution) přibližně na 14 hodin. Poté se gel přendá do CBB odbarvovacího roztoku (destaining solution) na dalších 14 hodin, pokud je roztok příliš zbarvený, je potřeba jej vyměnit za nový. Pokud je gel bezbarvý a zbarvené jsou pouze jednotlivé separované proteiny (proužky – „bandy“), přesune se gel do sušícího roztoku na přibližně 24 hodin. Následně se nechá gel usušit, nejlépe do folií, kde se dá narovnat a vyhladit.





Obrázek 15: Separační rozsahy proteinů v denaturační SDS-PAGE [72]

Tzv. „Running buffer“, který je pufr v elektroforetické vaně, je roztok Trisu, glycinu a dodecylsírany sodného, který dává molekulám proteinů záporný náboj. Elektroforéza probíhala pod napětím 70 V v oblasti zaostřovacího gelu a při 120 V v rozdělovacím gelu. Pro všechny elektroforézy byl použit marker Protein MW Marker, Wide Range (K494). Vzorky byly standardně připraveny – 1 μ l vzorku + 9 μ l dH₂O + 10 μ l sample buffer, 10 minut povařeny, do jamek se nanášelo 10 μ l vzorku pomocí pipet (trombocytární lyzáty). Pokud se jednalo o roztoky PVA s TL, bylo smícháno 10 μ l vzorku s 10 μ l sample buffer, 10 minut povařeno a do jamek bylo nanášeno 20 μ l.



Obrázek 16: SDS-PAGE elektroforéza



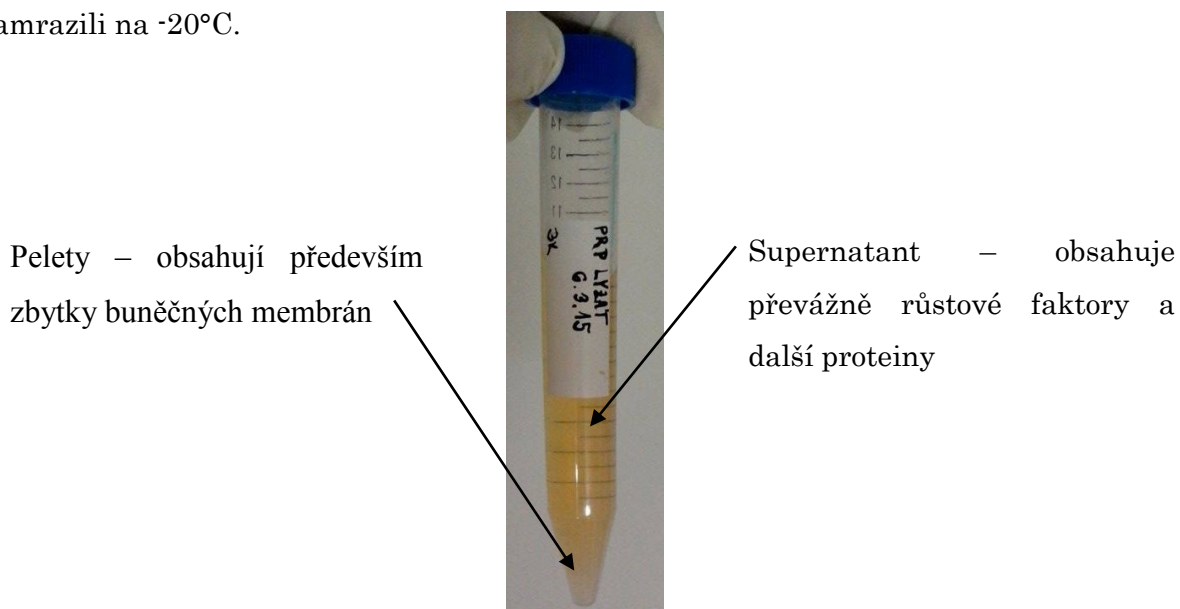
2.2 Výsledky a diskuze

Tato kapitola se věnuje výsledkům a diskuzi k jednotlivým experimentům. Nejprve bylo potřeba připravit trombocytární lyzáty a pokusit se ověřit přítomnost proteinů. Další část byla věnována enkapsulaci proteinů a optimalizaci výroby. V neposlední řadě se analyzovaly enkapsulované proteiny pomocí SDS-PAGE a metody podle Bradfordové.

2.2.1 Příprava trombocytárního lyzátu (TL)

Z TRS (Trombocytes-Rich Solution, TO KNL) byl připraven trombocytární lyzát dle postupu [70]. Dodaný roztok bohatý na trombocyty měl koncentraci trombocytů $715 \cdot 10^6/\text{ml}$. Roztok byl zmrazen na -80°C po dobu 12 hodin a následně rozmrazen ve vodní lázni (firma Labtech) na teplotu 37°C . Tento cyklus byl opakován celkem třikrát, aby se uvolnily všechny růstové faktory (Obr. 18). Dále se roztok zcentrifugoval za podmínek $900x \text{ g}/30 \text{ min}/20^\circ\text{C}$. Takto se oddělily pelety (neobsahující proteiny – Příloha A) od supernatantu obsahující růstové faktory (Obr. 19), který byl odpipetován a uskladněn v -80°C do použití.

Provedli jsme taktéž druhou metodu přípravy lyzátu podle [71]. Neprováděli jsme tedy již mnoho cyklů zamrazení, nýbrž pouze jedno. TRS jsme nechaly rozmrazit při 5°C v lednici (cca 14 hodin) a zcentrifugovali za podmínek $2830 \times \text{g}/30 \text{ min}/4^\circ\text{C}$. Supernatant jsme opět odpipetovali do 15 ml zkumavek a zamrazili na -20°C .



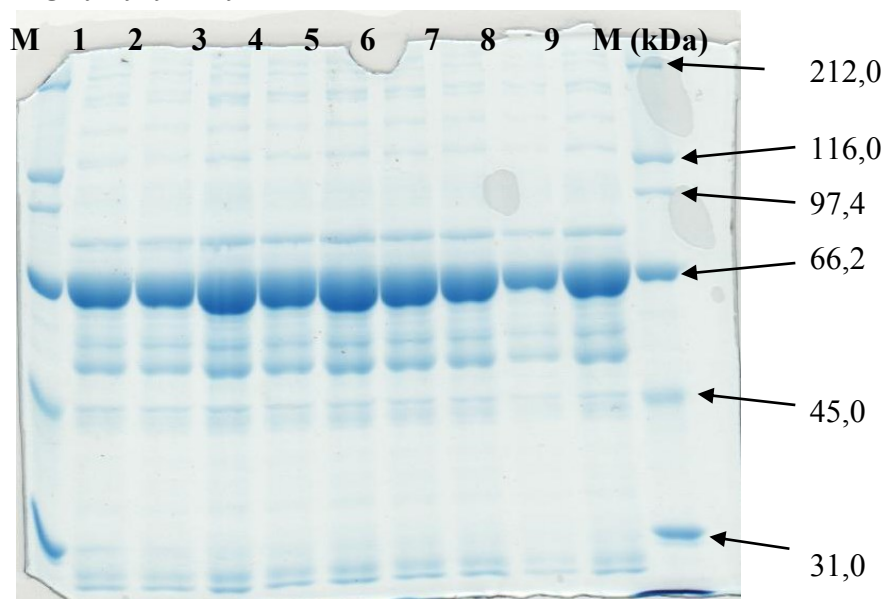
Obrázek 17: Trombocytární lyzát připravený druhou metodou lyzace



Pro zjištění obsahu proteinů (růstových faktorů) v jednotlivých fázích přípravy lyzátu byla provedena SDS-PAGE, tedy elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v roztoku dodecylsírany sodného. Pro první analýzu trombocytárních lyzátů byly použity dvě různé koncentrace polyakrylamidového gelu, a to 8% a 12%. 8% koncentrace gelu lépe rozděljuje proteiny s vyšší molekulovou hmotností, naopak 12% proteiny s nižšími hodnotami molekulové hmotnosti.

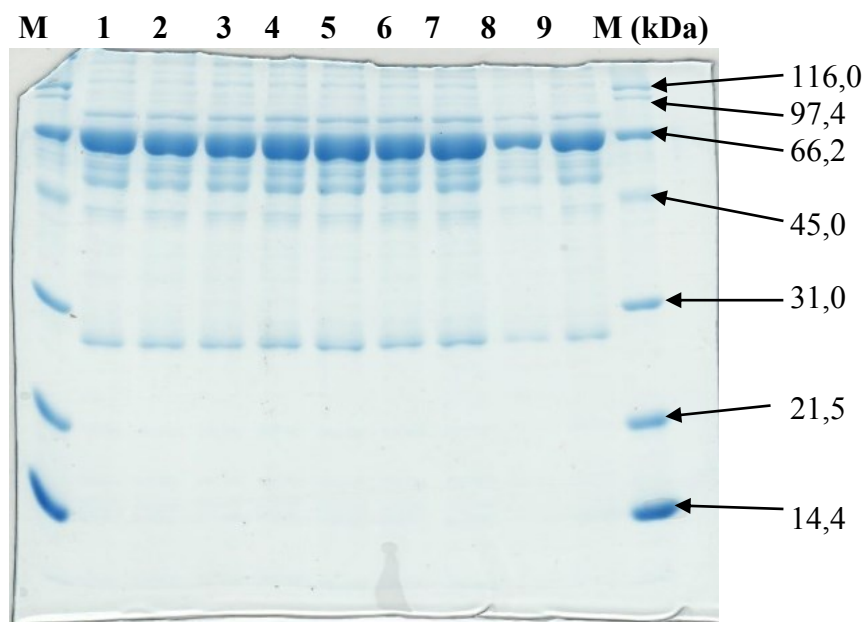
Byly zkoumány vzorky lyzátu po jednotlivém rozmrazení a podle místa uchovávání (lednice či mrazák), aby se zjistil vliv teploty na proteiny obsažené v lyzátu. Vzorky pro elektroforézu byly připraveny v poměru 1 μ l vzorku TL ku 9 μ l destilované vody ku 10 μ l vzorkového pufru. Do jamek v gelu se nanášelo 10 μ l, objem nanášeného lyzátu ve vzorku odpovídá 0,5 μ l připraveného lyzátu. Elektroforéza proběhla za klasických podmínek, popsaných v kapitole SDS-PAGE, při napětí 70 V v oblasti zaostřovacího gelu a poté bylo napětí zvýšeno na 120 V v rozdělovacím (rozlišovacím) 8%, popř. 12% gelu.

Po ukončení elektroforézy byly gely vyjmuty a vloženy do CBB barvicího roztoku, odbarvovacího roztoku pro odbarvení pozadí gelu a poté do sušícího roztoku. Jednotlivé gely vysychaly v celofánové folii.



Obrázek 18: 8% SDS-PAGE, první příprava lyzátu, vzorky: M - Marker Wide Range K 494, 1 – TRS lyzát po 1. rozmražení, 2 - TRS lyzát po 2. rozmražení, 3 - TRS lyzát po 3. rozmražení, 4 - Supernatant po stočení po 1. rozmražení (z lednice), 5 - Supernatant po stočení po 2. rozmražení (z lednice), 6 – Supernatant po stočení po 3. rozmražení (z lednice), 7 – Supernatant po stočení po 1. rozmražení (z mrazáku), 8 – Supernatant po stočení po 2. rozmražení (z mrazáku), 9 – Supernatant po stočení po 3. rozmražení (z mrazáku), M – Marker Wide Range K 494





Obrázek 19: 12 % SDS-PAGE, první příprava lyzátu, vzorky: M - Marker Wide Range K 494, 1 – TRS lyzát po 1. rozmražení, 2 - TRS lyzát po 2. rozmražení, 3 - TRS lyzát po 3. rozmražení, 4 - Supernatant po stočení po 1. rozmražení (z lednice), 5 - Supernatant po stočení po 2. rozmražení (z lednice), 6 – Supernatant po stočení po 3. rozmražení (z lednice), 7 – Supernatant po stočení po 1.rozmražení (z mrazáku), 8 – Supernatant po stočení po 2. rozmražení (z mrazáku), 9 – Supernatant po stočení po 3. rozmražení (z mrazáku), M – Marker Wide Range K 494

Z výsledků elektroforéz jsem došla k závěru, že pro naše účely získání nativních růstových faktorů nemusíme proces rozmrazování provádět třikrát, ale pouze jednou. Do obou gelů byly nanášeny stejné vzorky z jedné mikrozkuřavky. U 12 % gelu (Obr. 19) je vidět pouze rozdíl u vzorku číslo 8, což ale může být zapříčiněno chybou při pipetování vzorku do jamky v gelu. U 8 % gelu (Obr. 18) jsou patrnější rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Opět se nejvíce lišil vzorek číslo 8. První tři vzorky (1-3) byly odebrány ihned po jednotlivém rozmražení. Zde vidíme, že po 3. rozmrazení roztok zřejmě obsahuje největší množství proteinů, ovšem na 12 % gelu žádný rozdíl vidět není. U vzorku číslo 3 se tedy jedná o chybu v pipetování. Další tři vzorky (4-6) pochází se supernatantu po stočení TRS na centrifuze po jednotlivém rozmrazení, které byly uchovávány v lednici při 4°C po dobu 14 dnů. U těchto vzorků obsahuje největší množství proteinů vzorek číslo 5. Vzorky 7 a 9 jsou srovnatelné. Z výsledků elektroforézy je patrné, že většina proteinů se uvolní již po prvním cyklu rozmrazení. Vzhledem k tomu, že pro zachování nativity proteinů (růstových faktorů) by bylo lepší provádět co nejméně rozmrazovacích cyklů, jsme se rozhodli



provádět pouze jedno rozmrazení. Dalo by se tak předejít nechtěnému poškozování růstových faktorů.

2.2.2 Zařízení pro electrospraying a electrospinningu

Zařízení pro elektrostatické rozprašování z jehly

Pro tvorbu kapslí bylo použito zařízení pro elektrostatické rozprašování a zvlákňování z jehly, jak je znázorněno na obrázku 14. Byla použita stříkačka o objemu 12 ml (A) s jehlou o průměru 0,6 mm (0,4 mm), která obsahovala polymerní roztok s látkou určenou k enkapsulaci. Stříkačka byla umístěna do lineární pumpy KDS 100 (B). Výrobce této pumpy je firma KD Scientific, Holliston, MA, USA. Na jehlu byl přiveden kladný potenciál elektrického stejnosměrného napětí (C). Zdroj vysokého napětí (D) je od společnosti Spellman, New York, USA, s typovým označením SL 150, generující napětí v rozsahu od 0 do 70 kV a výstupním proudem 2,14 mA. Pro experimenty bylo použito napětí 25 kV. Jehla prochází otvorem v konstrukci (E), která zajišťuje lepší stabilitu nejen samotné jehly, ale i celého zařízení a umožňuje nastavení vzdálenosti kolektoru (F) od jehly, která se liší u každého polymeru. Kolektor se uzemní (G) a pomocí magnetu se na něj přichytí aluminiová fólie (H) pro zachycení vyrobených částic. Vzdálenost mezi kolektorem a jehlou byla v rozmezí 15 – 17 cm v závislosti na konkrétním pokusu.

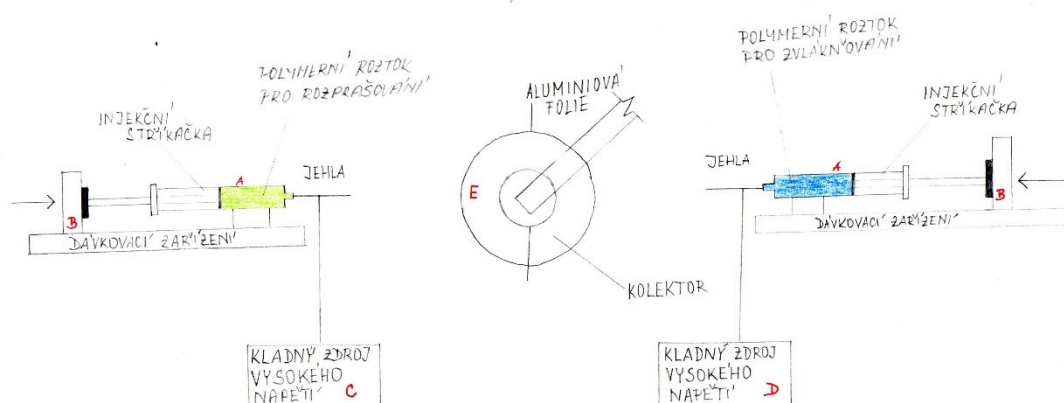


Obrázek 20: Zařízení pro elektrostatické rozprašování z jehly



Zařízení pro kombinaci electrospinningu a electrosprayingu

Pro kombinaci obou technologií bylo sestrojeno zařízení schématicky zobrazené na Obr. 15. Zvlákňování i rozprašování probíhalo pomocí stříkaček o objemu 12 ml (A), které byly umístěny naproti sobě. Jehly ve většině experimentů měly průměr 0,6 mm, v posledním pokuse ovšem byla použita pouze 0,4 mm pro zlepšení podmínek sprejování. Dávkování zajišťovaly opět lineární pumpy KDS 100 (B). Na konce obou jehel byly přivedeny kladné zdroje elektrického stejnosměrného napětí. První zdroj (C) byl totožný jako v předchozím zařízení. Druhým zdrojem (D) bylo zařízení značky Glassman High Voltage Inc., s označením ER50P6, které generuje napětí v rozsahu 0 až 50 kV a výstupní proud 6 mA. Pro experimenty bylo zvoleno napětí 25 kV. Uzemněný rotující váleček z vodivého materiálu (E) potažený aluminiovou folií sloužil jako kolektor. Umístění válečku bylo uprostřed mezi jehlami. Pohon kolektoru zajišťovalo elektronické řízení krokového motoru sestrojené na TUL. Vzdálenost mezi kolektorem a jehlami byla 15 cm.



Obrázek 21: Schéma zařízení pro electrospraying a electrospinningu

2.2.3 Enkapsulace lyzátů do PVA

Když už byl připraven trombocytární lyzát, bylo zapotřebí zjistit, zda vůbec půjde roztok polyvinylalkoholu s lyzáty rozprašovat. Bylo sestaveno zařízení popsané v kapitole 2.2.2. a připraven roztok polymeru PVA (Tab. 7). Jelikož bylo žádoucí vytvořit co nejmenší kapsle a zároveň použít rozpouštědlo co nejšetrnější k růstovým faktorům, zvolil se polyvinylalkohol se střední molekulovou hmotností



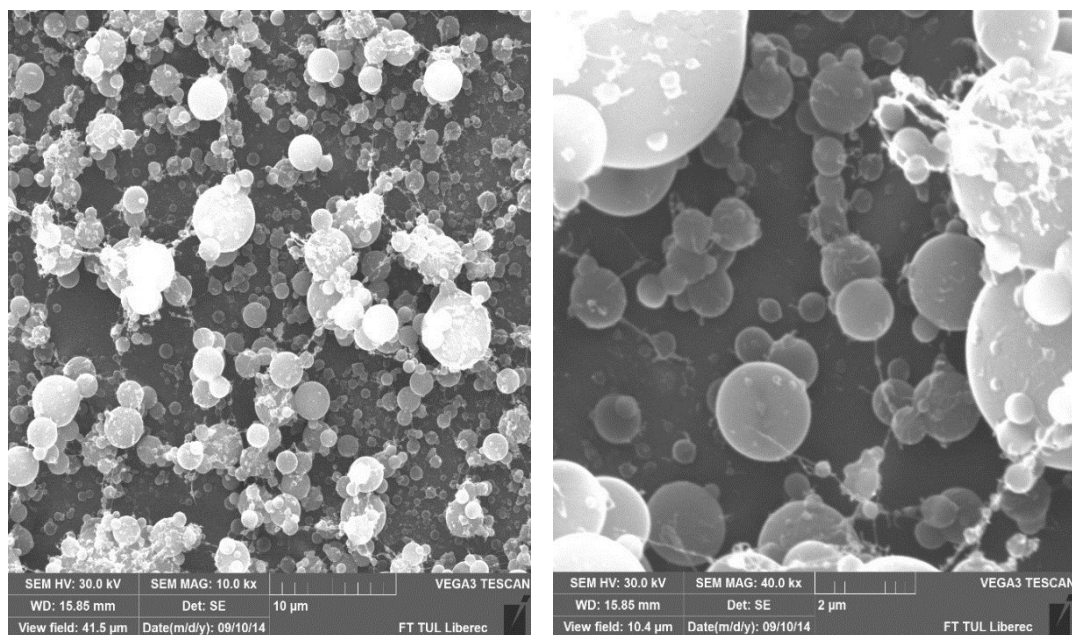
18.000 a jeho koncentrace v roztoku vždy činila 15%. Pro první dva experimenty byla rozpouštědlem voda s ethanolem v poměru 7:3.

Do roztoku polymeru se těsně před elektrostatickým rozprašováním přidal 1 ml trombocytárního lyzátu po 3. rozmrazení TRS.

Tabulka 7: Složení 15% roztoku PVA s 1 ml TL 1., 2. experiment

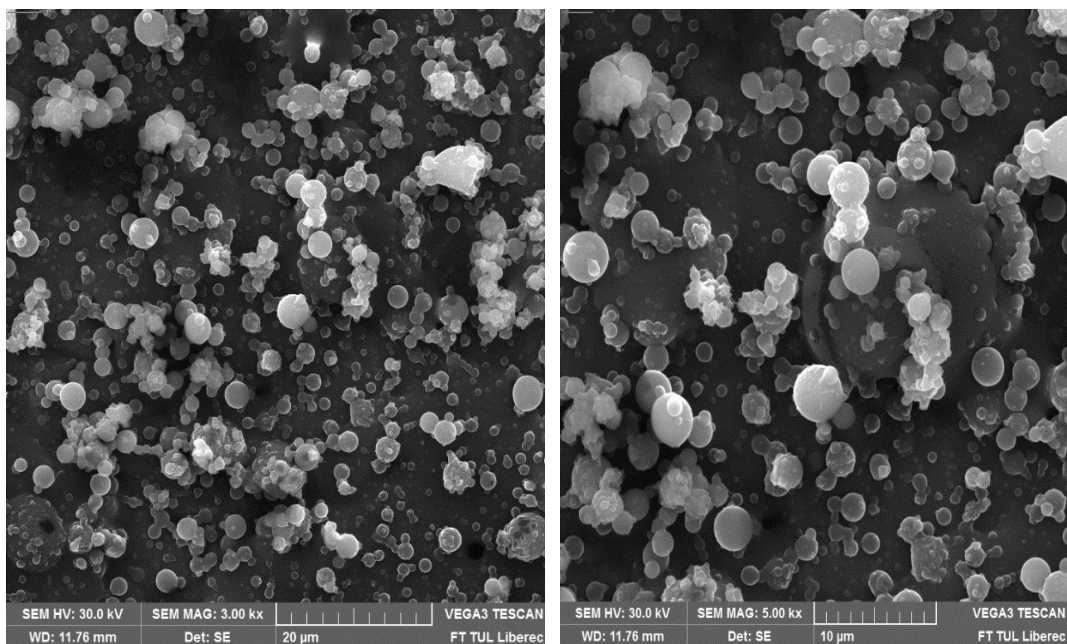
Hmotnost roztoku	PVA	VODA	ETHANOL	TROMBOCYT.LYZÁT
15 g	2,25 g	7,925 g	3,825 g	1 ml

Stříkačka o objemu 10 ml byla naplněna polymerním roztokem s lyzátem a vložena do zařízení na rozprašování (Obr. 20). Rozprašování probíhalo při 24,9 kV, rychlostí 1,3 ml/hod a vzdáleností kolektoru od jehly 16 cm. Kolektorem byla aluminiová folie. Doba sprejování byla 20 minut. Pro analýzu vyrobeného materiálu se vystříhl malý kousek alobalu, nalepil na terčík, pozlatil 7 mm vrstvou zlata na zlatičce Quorum a byly pořízeny snímky na elektronovém mikroskopu. První pokus (Obr. 22) proběhl o měsíc dříve než další dva (Obr. 23 a 24). Vzorky z 0. experimentu se uchovávaly v lednici při 5°C ve vodném roztoku.

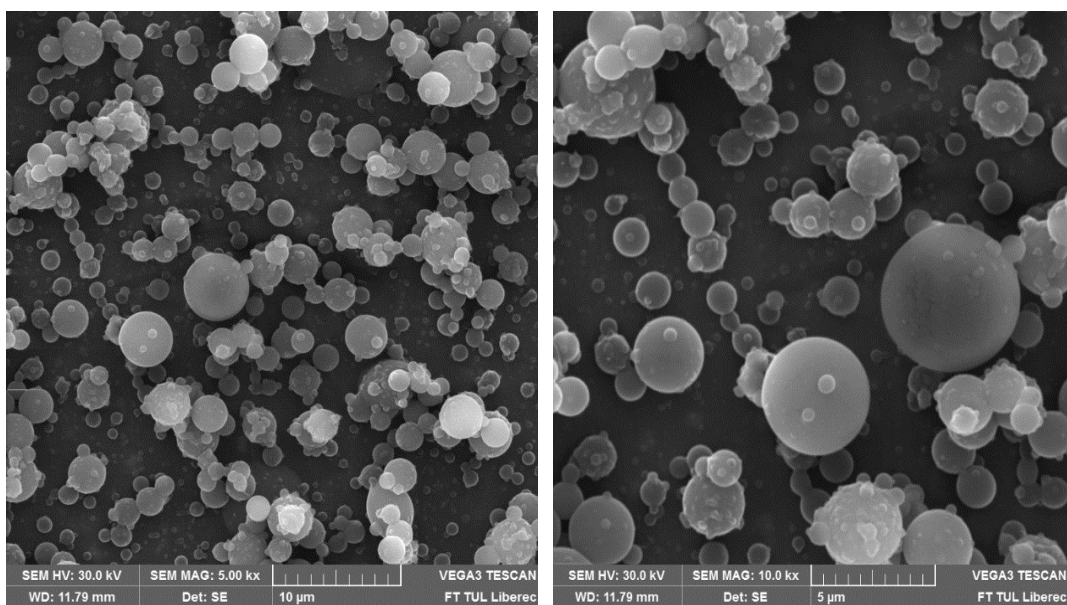


Obrázek 22: Snímek enkapsulovaného lyzátu v PVA, 0. pokus, zvětšeno 10 000x (vlevo) a 40 000x (vpravo)





Obrázek 23: Snímek enkapsulovaného lyzátu v PVA, 1. pokus, zvětšeno 3 000x (vlevo) a 5 000x (vpravo)



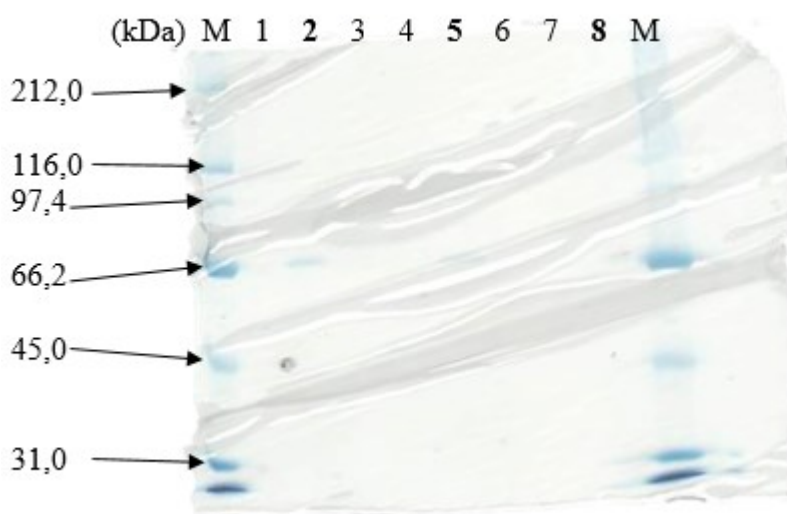
Obrázek 24: Snímek enkapsulovaného lyzátu v PVA, 2. pokus, zvětšeno 5 000x (vlevo) a 10 000x (vpravo)

Ze snímků z elektronového mikroskopu jsme opravdu potvrdili, že se nám podařilo vytvořit kapsle. U snímků prvního pokusu je znatelně méně kapslí než na ostatních snímcích, což částečně vysvětluje výsledky elektroforézy, která



nedetekovala množství proteinu. Zřejmě během rozprašování došlo k dočasnému pozastavení rozprašování. Při rozprašování dochází k aglomeraci, shlukování kapslí na kolektoru, zřejmě nedochází k odpaření většiny rozpouštědla obsaženého v kapkách, dalo by se to změnit větší vzdáleností kolektoru od hrotu jehly.

Další důležitou součástí experimentu bylo prokázání proteinů v nasprejovaných kapslích. Vzhledem k tomu, že celková hmotnostní koncentrace lyzátu v roztoku byla zhruba 6,7% a objem vysprejovaného objemu roztoku malý na velké ploše (cca 250 $\mu\text{l}/200\text{ cm}^2$), bylo analyzováno pomocí SDS-PAGE pouze množství kapslí na alobalu o obsahu 1 a 3 cm^2 (v 0,5 ml H_2O). Vzorky byly z centrální části rozprašování, kde se s největší pravděpodobností nachází nejvíce kapslí. Vždy se kousek o určeném obsahu (1 a 3 cm^2) promyl v mikrozkuhavce 0,5 ml dH_2O a vodný roztok sloužil jako výchozí roztok k elektroforéze. Byl použit 8% gel, z jednotlivých roztoků se odebralo 10 μl a povařilo s 10 μl vzorkového pufru. Do jamek v polyakrylamidovém gelu se nanášelo celých 20 μl . Elektroforéza probíhala za podmínek popsaných v kapitole 2.1.3.



Obrázek 25: 8% SDS-PAGE enkapsulované lyzáty v PVA, vzorky: M – marker Wide Range K494, 1 – 2. pokus kapslí 1 cm^2 , 2 – 2. pokus kapslí 3 cm^2 , 3 – 1. pokus kapslí 1 cm^2 , 4 – 1. pokus kapslí 3 cm^2 , 5 – 0. pokus kapsle 1 cm^2 , 6 – 0. pokus kapsle 3 cm^2 , 7 – roztok PVA s ethanollem, 8 – Rostok PVA + Trombocytární lyzát



Kromě markerů lze na gelu detekovat slabé bandy u vzorků 2, 5 a 8. První dva vzorky o různé ploše, ze které se získal roztok, byly již z druhého pokusu sprejování kapslí. U vzorku 2, který odpovídá 3 cm² nasprejované plochy, lze vidět malý obsah proteinů. Vzorky 3 a 4 byly provedeny stejný den jako 1 a 2, za stejných podmínek. Vzhledem k tomu, že koncentrace proteinů ve vzorcích je nízká, pohybujeme se u SDS-PAGE na hranici detekčního limitu. Při procesu rozprašování byly postupně upravovány podmínky dle konkrétní situace, a tudíž doba procesu nebyla u všech pokusů shodná. Při elektrostatickém rozprašování mohou být vytvářené kapsle i proteiny distribuovány nehomogenně. Vzorek 7 byl pouze negativní kontrolou obsahující roztok PVA s ethanolem. Poslední vzorek 8 byl naopak pozitivní kontrolou obsahující roztok PVA s ethanolem a trombocytárním lyzátem použitým při pokusech. Bohužel se mi nepodařilo hladce vysušit gel z elektroforézy, proto jsou na gelu vidět bubliny (Obr. 25).

2.2.4 Vliv koncentrace BSA na velikost částic

Třetí experiment sledoval nejen vliv koncentrace proteinu na velikosti kapslí, ale také možnost snížit obsah ethanolu v rozpouštědle. Byl zkoumán tedy zároveň poměr voda:ethanol 7:3 a 9:1, což by mělo být pro biologicky aktivní látky vhodnější. Ethanol totiž může denaturovat aktivní proteiny, proto je lepší omezení jeho objemu v rozpouštědle. BSA sloužilo jako modelový systém, kde je snadnější detekce proteinů na SDS-PAGE (obsahuje pouze 1 typ proteinu – jeden „band“).

Byly připraveny celkem tři zásobní roztoky BSA (hovězí sérový albumin frakce V) o koncentracích 0,1 mg/ml, 1 mg/ml a 10 mg/ml. BSA bylo zvoleno pro lepší detekci při SDS-PAGE, kde obsahuje pouze jeden proužek tzv. „band“. Příprava roztoků proběhla den před samotným rozprašováním a byly skladovány v lednici při teplotě 4°C. Roztoky BSA byly přidány do roztoků polymeru stejně jako trombocytární lyzáty – vždy po 1 ml. Celková hmotnost každého roztoku pro rozprašování činila 15 g.



Tabulka 8: Složení jednotlivých roztoků PVA s BSA

Voda:Ethanol	7:3	9:1
PVA	2,25 g	2,25 g
Destilovaná voda	7,925 g	10,475 g
Ethanol	3,825 g	1,275 g
Roztok BSA	1 ml	1 ml

Při electrosprayingu byly použity obroušené jehly s průměrem 0,6 mm, kolektor s aluminiovou folií se nacházel ve vzdálenosti 15 cm od hrotu jehly. Čas rozprašování se pohyboval v rozmezí 15 až 25 minut dle průběhu procesu rozprašování u jednotlivých roztoků. U prvního vzorku se začínalo dávkovat rychlostí 0,5 ml/hod, ale postupně bylo potřeba snižovat rychlost až na konečných 0,15 ml/hod, které se používalo jako výchozí u dalších vzorků.

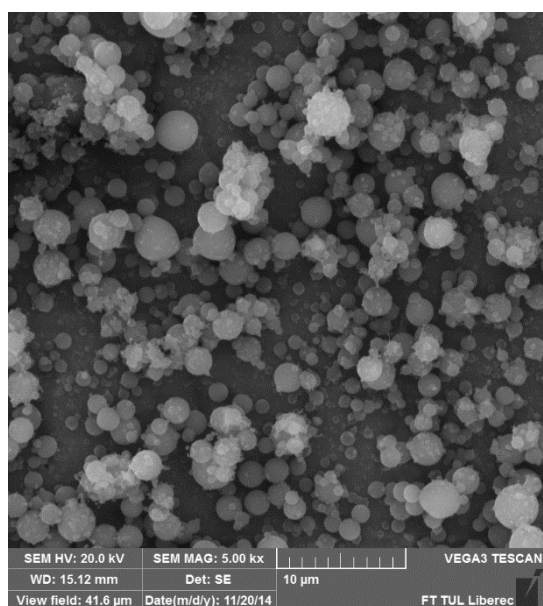
Tabulka 9: Rychlost dávkování pro jednotlivé roztoky v závislosti na koncentraci BSA a poměru rozpouštědla

Poměr voda:ethanol	Koncentrace BSA	Rychlost dávkování
7:3	10 mg/ml	0,5 – 0,15 ml/hod
7:3	1 mg/ml	0,15 ml/hod
7:3	0,1 mg/ml	0,15 ml/hod
9:1	10 mg/ml	0,10 ml/hod
9:1	1 mg/ml	0,15 ml/hod
9:1	0,1 mg/ml	0,15 ml/hod

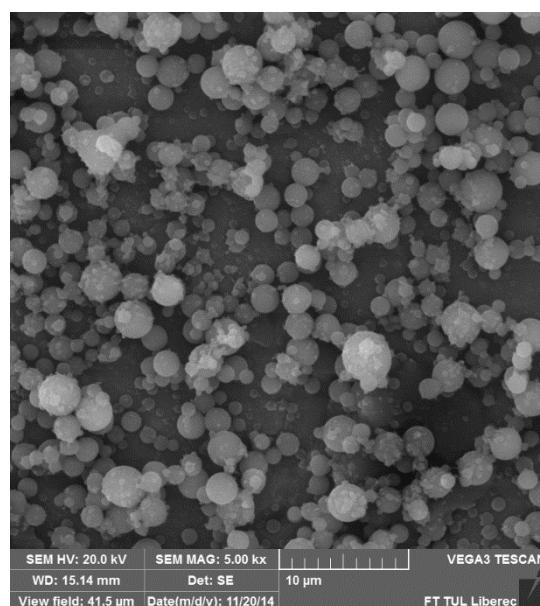
Z každého alobalu byl pořízen vzorek nasprejovaných kapslí a mikroskopován (Obr. 26-31). Byla zároveň provedena analýza velikosti částic jednotlivých vzorků (Tab. 10). Taktéž se provedla analýza pomocí SDS-PAGE. Pro analýzu obsahu proteinů byla z každého alobalu vystřižena plocha o obsahu 25 cm² (5x5 cm) ze středové centrální části a rozpuštěna v 0,5 ml destilované vody v mikrozkuhavce. Pro elektroforézu se smíchalo 10 µl roztoku rozpuštěných kapslí a 10 µl vzorkového pufru a následně 10 minut povařilo. Do jamek se následně nanášelo 20 µl.



Nejprve se pomocí SEM analyzovaly vzorky s použitým rozpouštědlem voda:ethanol v poměru 7:3. Ze snímků je parné, že velikost částic u vzorku s koncentrací BSA 10 mg/ml je větší než u dvou ostatních. Tento vzorek byl vytvořen jako první, proto se domnívám, že je to zapříčiněno optimalizací rychlosti dávkování roztoku během procesu. Následně se analyzovaly vzorky s použitým rozpouštědlem voda:ethanol v poměru 9:1. Na první pohled jsou kapsle menší než při použití větší koncentrace ethanolu. Pro zjištění střední velikosti částic se měřily průměry částic z jednotlivých částí vzorku, vždy bylo provedeno celkem 100 měření z 5 oblastí.

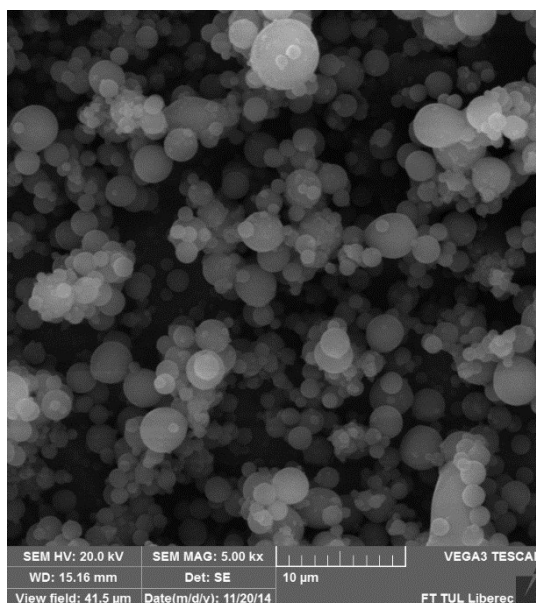


Obrázek 26: Snímek PVA kapsle s 0,1 mg/ml BSA, poměr rozpouštědla 7:3, zvětšeno 5 000x

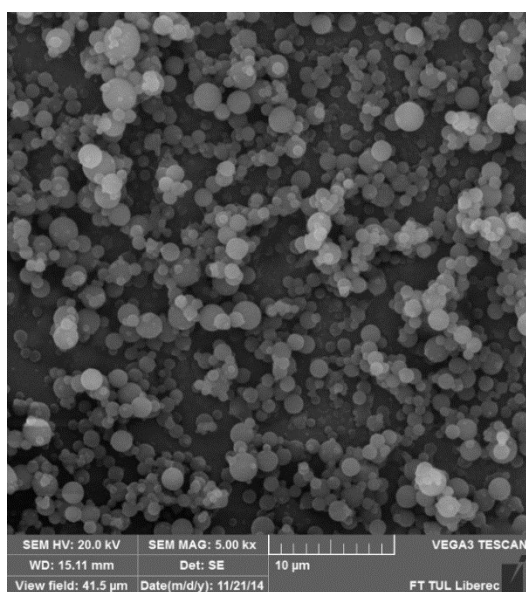


Obrázek 27: Snímek PVA kapsle s 1 mg/ml BSA, poměr rozpouštědla 7:3, zvětšeno 5 000x

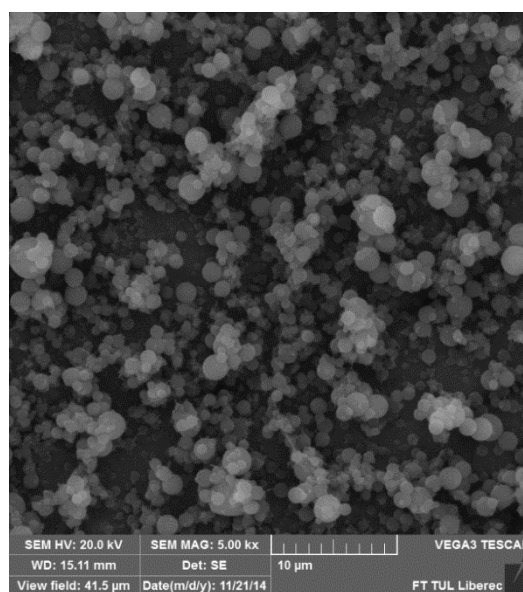




Obrázek 28: Snímek PVA kapsle s 10 mg/ml BSA, poměr rozpouštědla 7:3, zvětšeno 5 000x

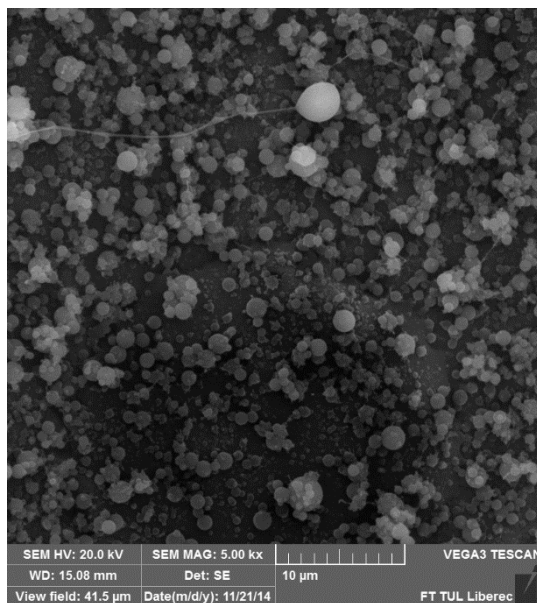


Obrázek 29: Snímek PVA kapsle s 0,1 mg/ml BSA, poměr rozpouštědla 9:1, zvětšeno 5 000x



Obrázek 30: Snímek PVA kapsle s 1 mg/ml BSA, poměr rozpouštědla 9:1, zvětšeno 5 000x





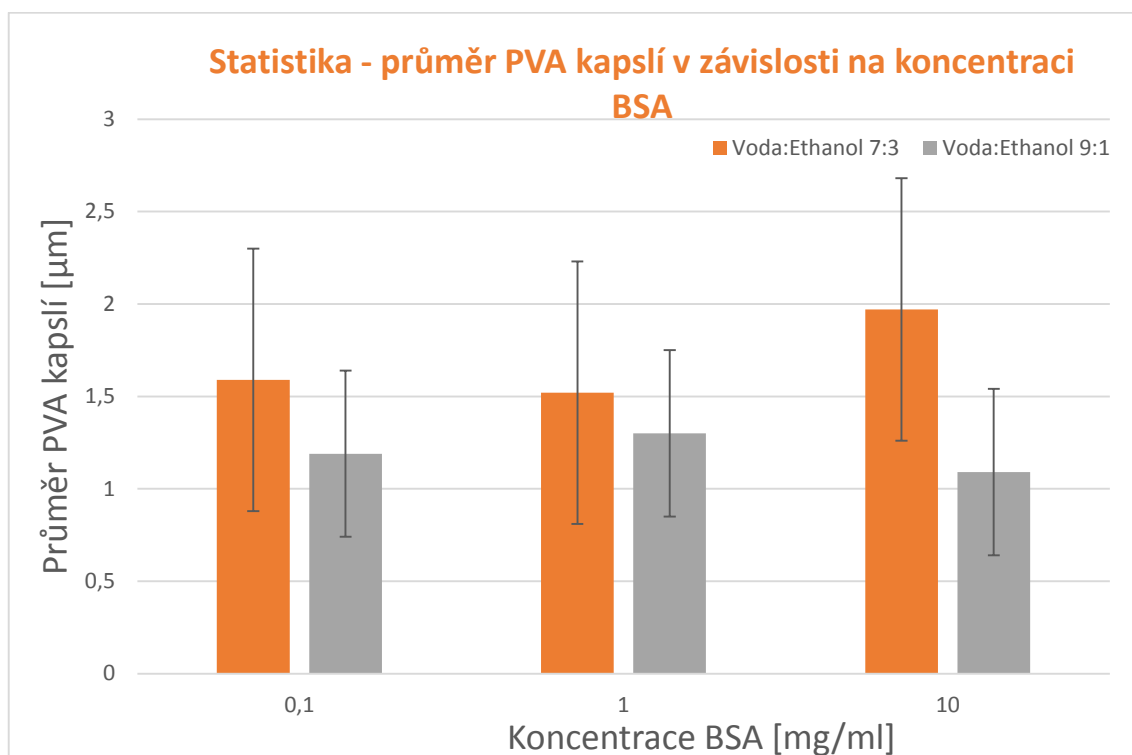
Obrázek 31: Snímek PVA kapsle s 10 mg/ml BSA, poměr rozpouštědla 9:1, zvětšeno 5 000x

Z výsledků průměrů PVA kapslí vypsanych v Tabulka 10 nelze jednoznačně vyvodit závislost průměru kapslí na obsahu enkapsulovaných proteinů. Naopak je vidět změna velikosti kapslí při použití jiného poměru rozpouštědla. Při použití v poměru 9:1 vznikají menší kapsle (Graf 1) kolem 1,20 μm , při použití poměru 7:3 vznikají v průměru kapsle 1,70 μm .

Tabulka 10: Naměřené průměry PVA kapslí

Poměr rozpouštědla	Koncentrace BSA	Průměr kapslí [μm]	Směrodatná odchylka	Minimum [μm]	Maximum [μm]
7:3	0,1	1,59	0,72	0,55	4,80
	1,0	1,52	0,65	0,71	4,00
	10,0	1,97	0,75	1,97	5,31
9:1	0,1	1,19	0,44	0,48	2,59
	1,0	1,30	0,48	0,56	2,81
	10,0	1,09	0,43	0,46	3,03





Graf 1: Průměr kapslí v závislosti na koncentraci BSA

Bohužel koncentrace BSA v roztocích byla pod detekčním limitem SDS-PAGE, proto se nám touto metodou nepodařilo prokázat přítomnost proteinu (BSA) v kapslích. S použitím TRS lze připravit roztoky s vyšším obsahem proteinů, a proto byl dále používán jen trombocytární lyzát.

2.2.5 Detekce proteinů v kapslích

PVA kapsle s PVA vlákny

Další experimenty se prováděly pro zjištění, zda se enkapsulovaná látka nachází uvnitř kapsle či na jeho povrchu, zároveň pro zjištění vhodného množství lyzátu pro elektrostatické rozprašování. Bylo nutné sestavit zařízení obsahující zařízení na electrospraying a z druhé strany kolektoru bylo umístěné totožné zařízení pro účel electrospinningu. Místo kovové desky potažené aluminiovou folií byl zvolen rotační váleček potažený aluminiovou folií, který se otáčel pomocí krokového motoru (KNT, TUL) (Obr. 21).



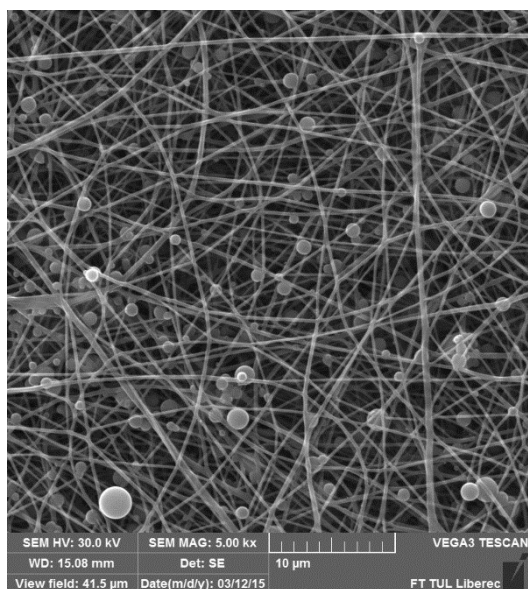
Vzdálenost kolektoru od obou jehel činila 15 cm. Jedna jehla obsahovala 10% roztok PVA pro zvlákňování. Druhá jehla pak obsahovala 15% roztoky PVA s různými množstvími trombocytárního lyzátu – 0 ml, 1 ml a 2 ml. Rozprašování i zvlákňování probíhalo při napětí 25 kV, rychlost dávkování pro kapsle byla 0,10 ml/hod, pro vlákna byla 0,7 ml/hod a doba výroby se pohybovala okolo 35 až 40 minut.

Tabulka 11: Složení roztoku PVA pro electrospinning 4. a 5. experiment

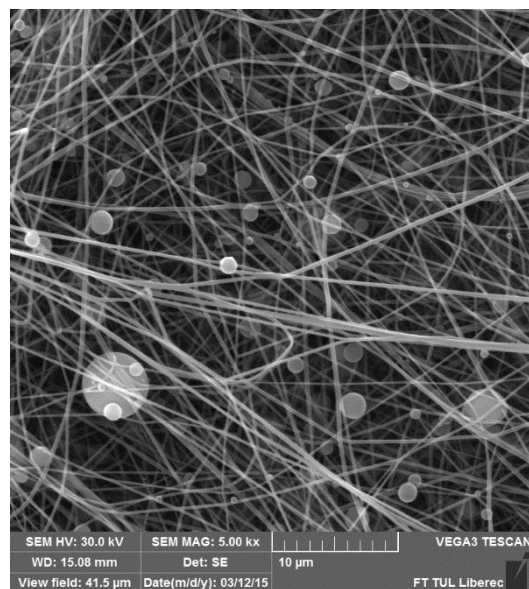
10% roztok PVA na vlákna (30 g)	
16% PVA Sloviol R	18,75 g
Destilovaná voda	11,25 g

Tabulka 12: Složení roztoku PVA pro electrospraying 4. a 5. experiment

15% roztok PVA na kapsle (15 g)		
	1 ml lyzátu	1,5 ml lyzátu
PVA 18.000 MW	2,25 g	2,25 g
Destilovaná voda	10,475 g	9,975 g
Ethanol	1,275 g	1,275 g

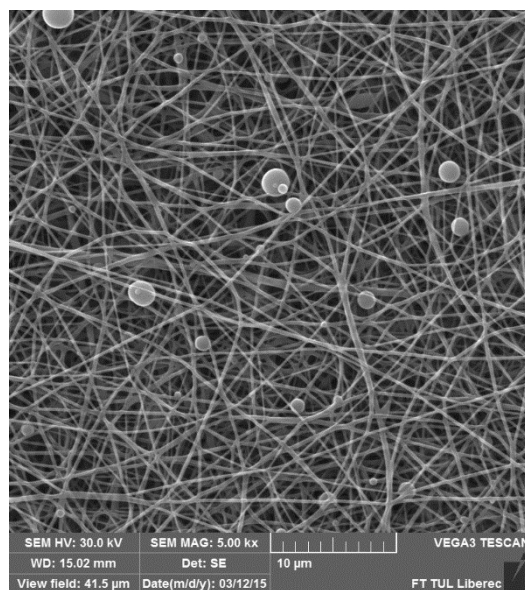


Obrázek 32: Snímek 1.enkapsulace PVA vlákna a PVA kapsle bez lyzátu, zvětšeno 5 000x



Obrázek 33: Snímek 1.enkapsulace PVA vlákna a PVA kapsle s 1 ml TL, zvětšeno 5 000x





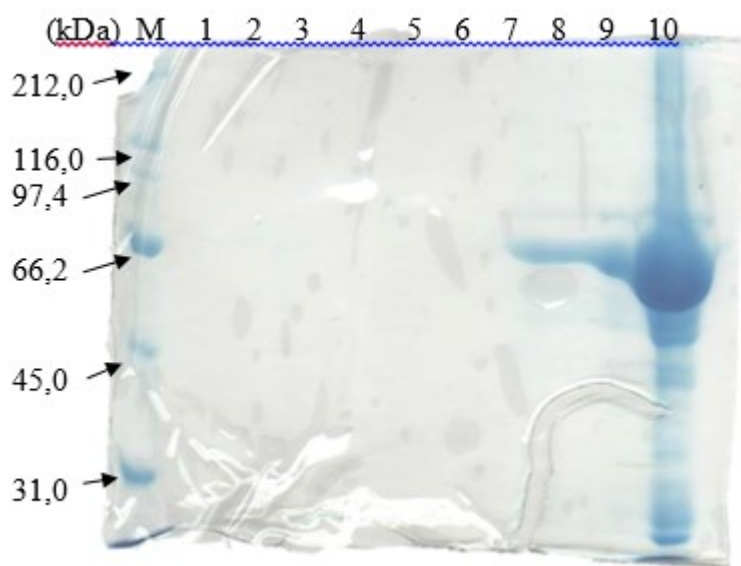
Obrázek 34: Snímek 1. enkapsulace PVA vlákna a PVA kapsle s 2 ml TL, zvětšeno 5 000x

Nejméně kapslí bylo shledáno u vzorku PVA kapslí s 2 ml lyzátu, roztok byl již na pohled hustší a bylo nejvíce problémů se samotným procesem elektrostatického rozprašování. Domnívám se, že obsah proteinů ve dvou mililitrech trombocytárního lyzátu je příliš velký pro tuto metodu enkapsulace. PVA kapsle bez lyzátu se tvořily snadno a také vykazují nejmenší průměry. Z roztoku s 1 ml lyzátu vznikalo mnoho kapslí, které byly mezi vlákny.

Z každého alobalu se následně vystříhly malé kousky pro mikroskop a také 2 čtverce o obsahu 25 cm² (2x 5x5 cm), které se nacházely ve středním pruhu, kde je pravděpodobně největší množství kapslí. První čtverec obsahující nasprejované kapsle s vlákny se promyje v 0,5 ml destilované vody v mikrozkuhavce, tím by se mělo získat celkové množství proteinů obsažené v nasprejovaných kapslích. Druhý čtverec se nejprve promyje v 0,5 ml chloroformu, ten zajistí odmytí proteinů, které jsou mimo kapsle či na jejich povrchu. Roztok chloroformu je odpipetován do jiné mikrozkuhavky a do původní se napipetuje 0,5 ml destilované vody pro rozpuštění PVA kapslí. Všechny tři vzorky z každého alobalu (1 - rozpuštění pouze v destilované vodě, 2 - rozpuštění kapslí v chloroformu a 3 - oplach destilovanou vodou po odpipetování chloroformu) se analyzují pomocí SDS-PAGE.



U elektroforézy je použit 8% polyakrylamidový gel, 10µl vzorku je smícháno a povařeno s 10 µl vzorkového pufru a napipetováno do jamek v gelu.

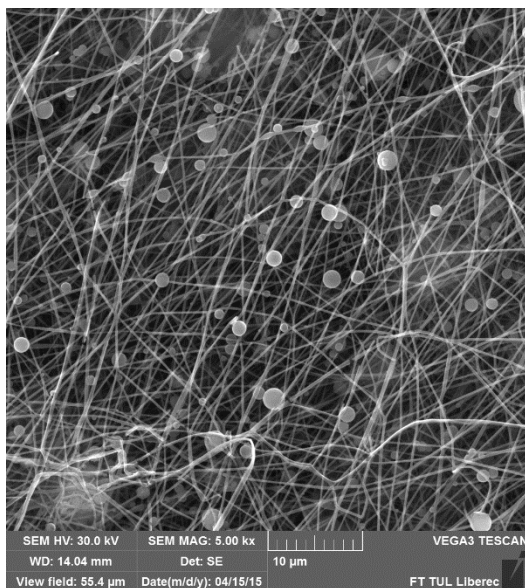


Obrázek 35: 8% SDS-PAGE 1.enkapsulace TL do kapslí s vlákny, M - marker Wide Range K494, 1 - kapsle 0 ml TL ve vodě, 2 - kapsle 1 ml TL ve vodě, 3 - kapsle 2 ml TL ve vodě, 4 - kapsle 0 ml TL v chloroformu, 5 - kapsle 1 ml TL v chloroformu, 6 - kapsle 2 ml TL v chloroformu, 7 – kapsle 0 ml TL ve vodě po chloroformu, 8 – kapsle 1 ml TL ve vodě po chloroformu, 9 – kapsle 2 ml TL ve vodě po chloroformu, 10 – trombocytární lyzát

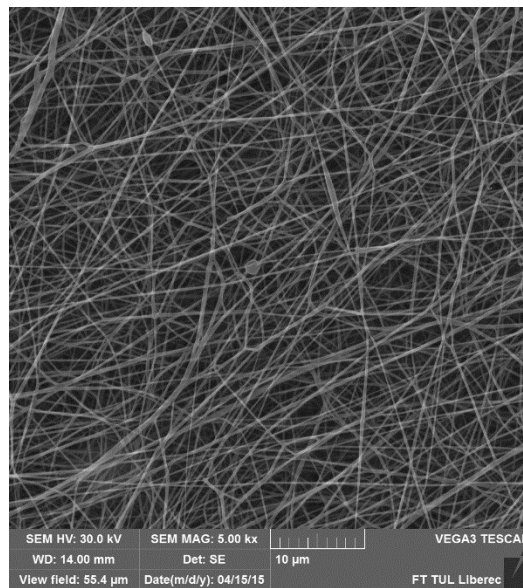
U první enkapsulace nebylo detekováno pomocí SDS-PAGE žádné množství proteinu. Vzorek číslo 9 nekoresponduje s výsledky z elektronového mikroskopu. Proto se domnívám, že došlo k „vylití“ koncentrovaného trombocytárního lyzátu.

Vzhledem k tomu, že se roztok PVA s 2 ml trombocytárního lyzátu špatně rozprašoval, připravili jsme roztoky PVA o koncentraci 1 a 1,5 ml trombocytárního lyzátu v roztocích. Následně jsme se rozprašovali při stejných podmínkách jako předchozí pokus. Vzorky byly zkoumány elektronovým mikroskopem a SDS-PAGE.



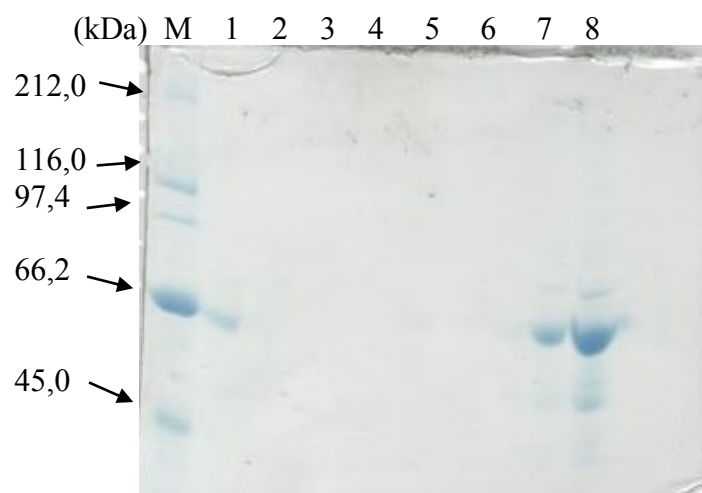


Obrázek 36: Snímek 2.enkapsulace PVA vlákna a PVA kapsle s 1 ml lyzátu, zvětšeno 5 000x



Obrázek 37: Snímek 2.enkapsulace PVA vlákna a PVA kapsle s 1,5 ml lyzátu, zvětšeno 5 000x

U elektrostatického rozprašování roztoku PVA s 1 ml lyzátu docházelo ke vzniku mnoha malých kapslí. U druhého množství lyzátu vznikly technické problémy v průběhu electrosprayingu, nedocházelo k rozprašování polymerního roztoku. Tato skutečnost byla zjištěna až po skončení procesu. Snímek ze SEM nám to potvrdil, na celém vzorku se vyskytovalo pouze pár kapslí. (Obr. 37)



Obrázek 38: 8% SDS-PAGE 2.enkapsulace TL do kapslí, M - marker Wide Range K494, 1 - kapsle 1 ml TL ve vodě, 2 - kapsle 1,5 ml TL ve vodě, 3 - kapsle 1 ml TL v chloroformu, 4 - kapsle 1,5 ml TL v chloroformu, 5 - kapsle 1 ml TL ve vodě po chloroformu, 6 - kapsle 1,5 ml TL ve vodě po chloroformu, 7 – roztok PVA s 1 ml TL, 8 – roztok PVA s 1,5 ml TL



U druhé enkapsulace (Obr. 38) se detekoval pouze „band“ u vzorku 1 (kapsle z roztoku s 1 ml TL rozpuštěných ve vodě), jinak množství trombocytárních lyzátů v nasprejovaných kapslích zřejmě nebylo natolik velké pro detekci na SDS-PAGE pomocí CBBR, což koresponduje se snímky z elektronového mikroskopu (Obr. 37). Ze vzorků 7 a 8 je vidět, že PVA smíchané s 1 ml lyzátu obsahuje méně proteinů, než PVA s 1,5 ml lyzátu.

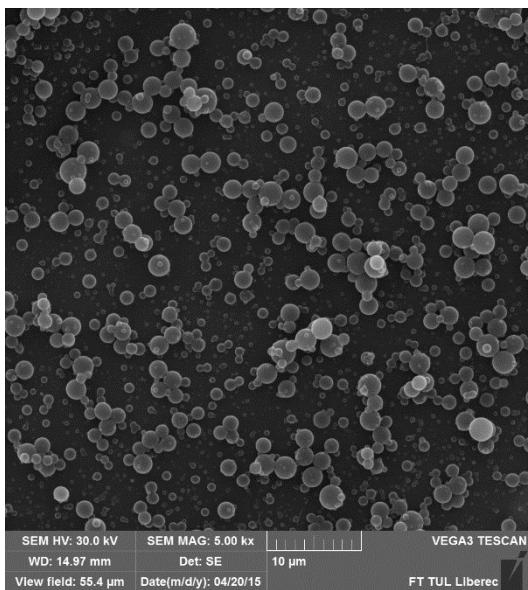
PVA kapsle

V dalším experimentu již nebylo použito zařízení pro electrospinning. Ve své podstatě jde jen prokázat zvýšené množství proteinů v kapslích při delší době rozprašování. Připravily se dva 15% roztoky PVA o hmotnosti 15 g, jeden neobsahoval žádné množství trombocytárních lyzátů, druhý pak 1 ml. Každý roztok se sprejoval po 2 doby – 20 a 40 minut. Dalším rozdílem bylo použití jehly o průměru 0,4 mm místo jehly 0,6 mm, která nebyla k dispozici. Rychlost dávkování všech roztoků byla 0,03 ml/hod a vzdálenost kolektoru od hrotu jehly činila 18 cm. Z jednotlivých aluminiových folií byly odebrány vzorky pro SEM a dva vzorky po 25 cm² pro SDS-PAGE jako v předchozím případě. Vše bylo stejnou metodou analyzováno.

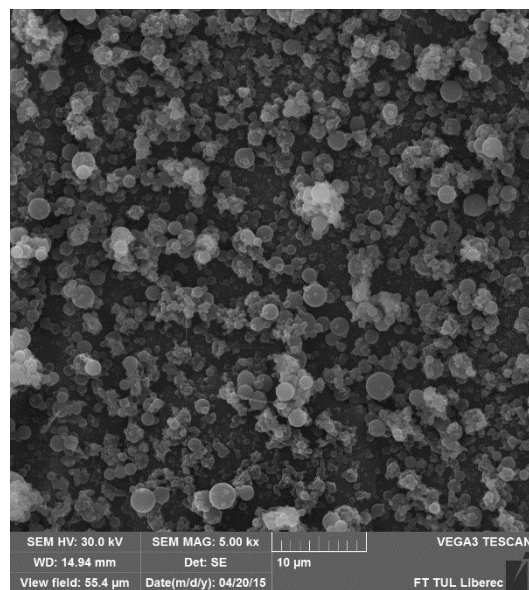
Tabulka 13: Složení roztoku PVA pro electrospaying 6. experiment

15% PVA roztok na kapsle (15 g)		
	0 ml lyzátu	1 ml lyzátu
PVA 18.000 MW	2,25 g	2,25 g
Destilovaná voda	11,475 g	10,475 g
Ethanol	1,275 g	1,275 g

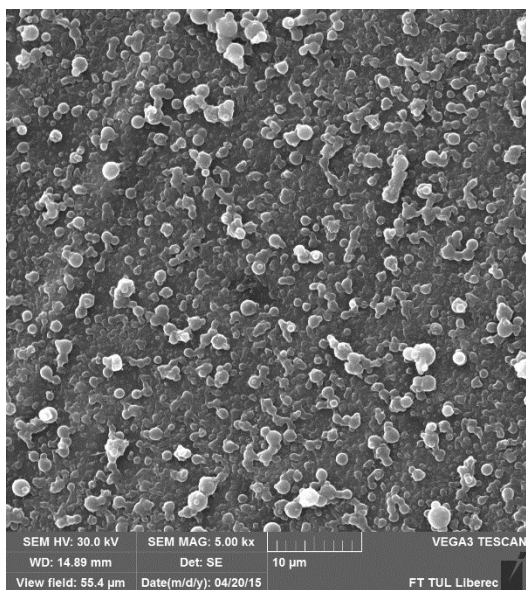




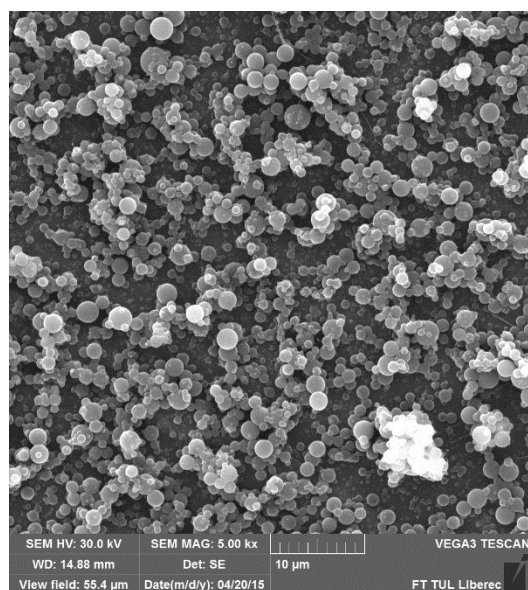
Obrázek 39: Snímek SEM PVA kapsle bez trombocytárního lyzátu, 20 minut rozprašování



Obrázek 40: Snímek PVA kapsle bez trombocytárního lyzátu, 40 minut rozprašování



Obrázek 41: Snímek SEM PVA kapsle s 1 ml trombocytárního lyzátu, 20 minut rozprašování



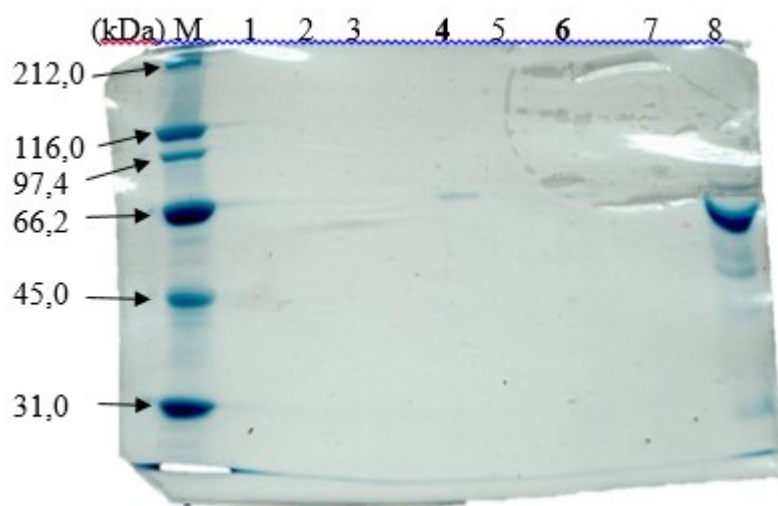
Obrázek 42: Snímek SEM PVA kapsle s 1 ml trombocytárního lyzátu, 40 minut rozprašování

Kapsle čistého roztoku PVA byly malých velikostí a kulového charakteru, při delší době electrosprayingu docházelo k agregaci (shlukování) kapslí (Obr. 40).



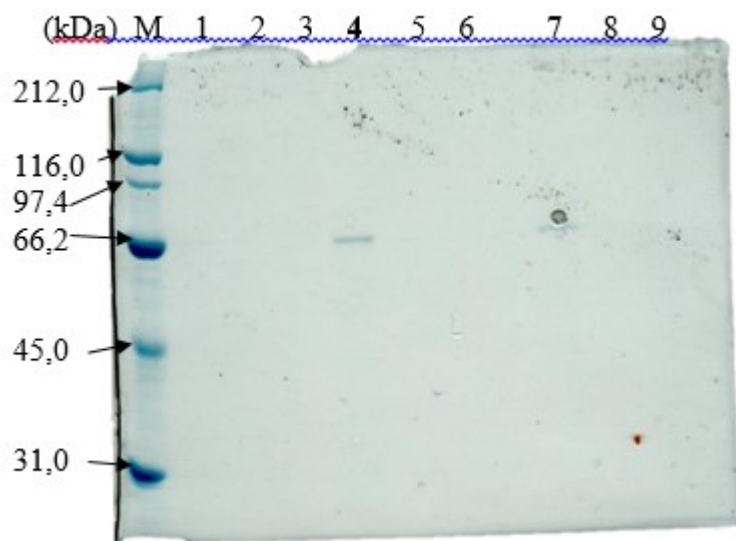
Velikost kapslí by mohla být částečně určena také průměrem jehly, ze které se rozprašuje. Jediný tento experiment byl prováděn s jehlou s průměrem 0,4 mm.

Na snímcích z rastrovacího elektronového mikroskopu (obr 41 a 42) vidíme nasprejované PVA kapsle, které obsahují trombocytární lyzát. V prvním případě byla doba sprejování 20 minut, vznikly zaoblené útvary s kapslemi. Zřejmě nedocházelo k úplnému odpaření rozpouštědla před zachycením kapsle na kolektor. V druhém případě byla doba sprejování dvojnásobná, tedy 40 minut. I když nebyla provedena žádná změna v dávkování ani v ostatních parametrech, vznikaly zde kapsle, které se občas spolu shlukovaly. Kapsle mají podobný průměr (přibližně 1 – 2 μm).



Obrázek 43: 8% SDS-PAGE, 1. gel 20 minut sprejování, vzorky: M - marker Wide Range K494, 1 - PVA 0 ml TL voda, 2 - PVA 0 ml TL chloroform, 3 - PVA 0 ml TL voda po chloroformu, 4 - PVA 1 ml TL voda, 5 - PVA 1 ml TL chloroform, 6 - PVA 1 ml TL voda po chloroformu, 7 - roztok PVA 0 ml TL, 8 - roztok PVA 1ml TL





Obrázek 44: 8% SDS-PAGE, 2. gel 40 min a 20 min s TL, vzorky: M - marker Wide Range K494, 1 - PVA 0 ml TL voda, 2 - PVA 0 ml TL chloroform, 3 - PVA 0 ml TL voda po chloroformu, 4 - PVA 1 ml TL voda, 5 - PVA 1 ml TL chloroform, 6 - PVA 1 ml TL voda po chloroformu, 7 – 20 min PVA 1 ml TL voda, 8 – 20 min PVA 1 ml TL chloroform, 9 – 20 min PVA 1 ml TL voda po chloroformu

Z provedené elektroforézy se prokázalo množství proteinů v roztocích PVA kapslí s 1 ml trombocytárního lyzátu po 20 minutách sprejování ve vodě (obr. 43 vzorek 4/obr.44 vzorek 7) a ve vodě po chloroformu (obr. 43 vzorek 6). Dále se prokázaly proteiny u roztoku PVA s 1 ml TL po 40 minutách sprejování ve vodě (obr. 44 vzorek 4). U dalších roztoků PVA s trombocytárním lyzátem se zřejmě nevyskytovalo takové množství proteinů, které by byly detekovatelné touto metodou. Pro lepší citlivost metody by bylo vhodné použít např. barvení stříbrem.

2.2.6 Metoda podle Bradfordové

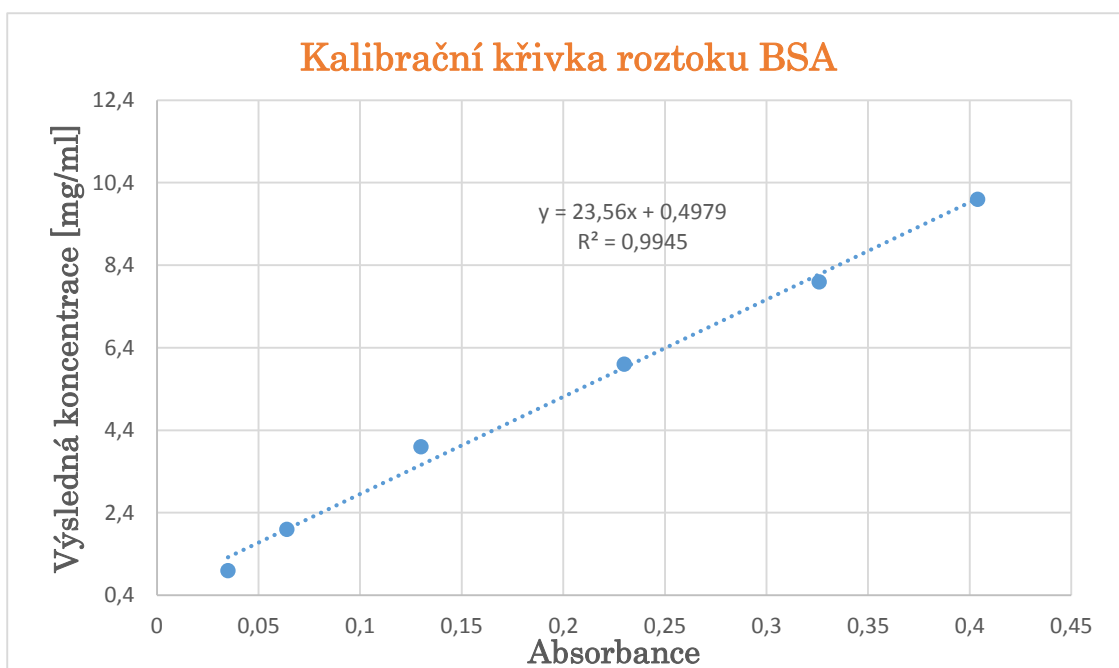
Pro zjištění koncentrace trombocytárního lyzátu v PVA kapslích byla potřeba proměřit kalibrační křivku. Jako standard byl zvolen roztok BSA o koncentraci 0,1 mg/ml (v destilované vodě). Pro kalibraci byly připraveny roztoky dle následující tabulky:



Tabulka 14: Kalibrace BSA roztoku

BSA [μl]	10	20	40	60	80	100
H₂O [μl]	90	80	60	40	20	0

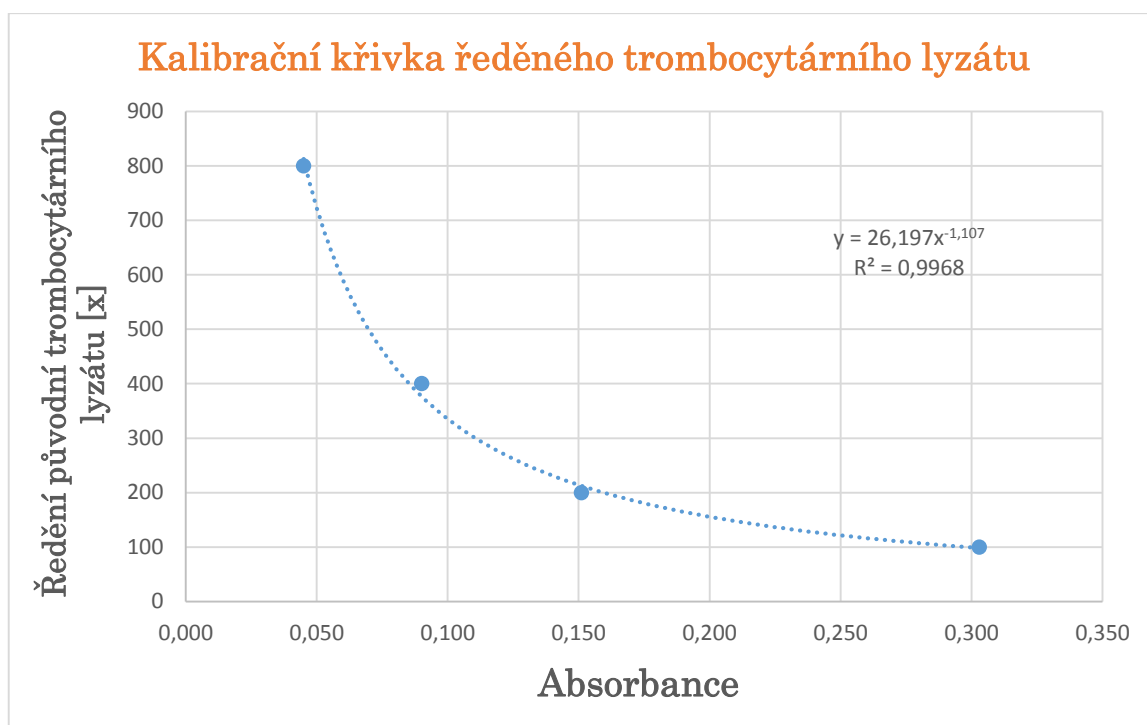
Z těchto roztoků se vždy 20 μl smíchalo s činidlem (180 μl) v mikrotitrační destičce a nechalo se 5 minut inkubovat, následně se změřila absorbance při vlnové délce 570 nm. Z výsledných hodnot absorbance se odečetla hodnota slepého vzorku (tzv. blank), vzniklé hodnoty byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci roztoku.



Graf 2: Kalibrační křivka BSA

U roztoku trombocytárního lyzátu byla provedena koncentrační řada – 100x, 200x, 400x a 800x ředěný roztok a následně se jednotlivé vzorky (20 μl) smíchaly s činidlem Bradfordové (180 μl), nechaly 5 minut inkubovat a změřily se odpovídající hodnoty absorbance při vlnové délce 570 nm. Následně se odečetla absorbance blanku (slepého vzorku) od hodnot absorbance vzorků a vynesla do grafu. Absorbance klesá s násobkem ředění roztoku a to v poměru jednotlivých ředění.

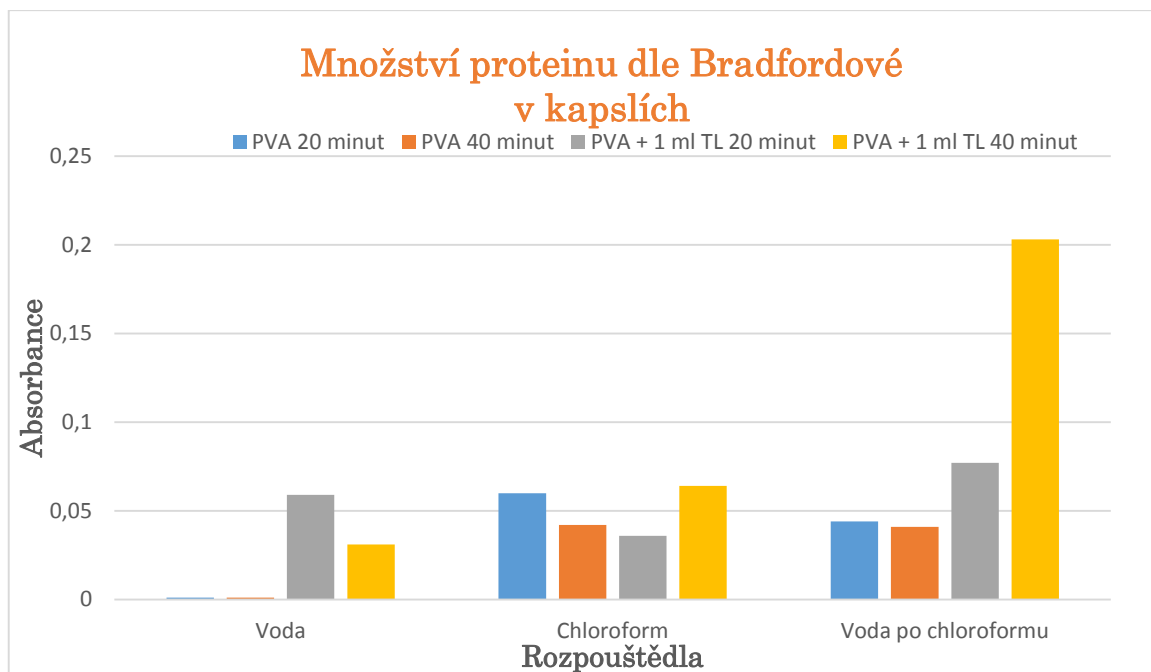




Graf 3: Kalibrační křivka ředěného trombocytárního lyzátu

Tuto metodu jsme vyzkoušeli u posledního pokusu, kdy jsme rozprašovali PVA roztoky bez trombocytárního lyzátu a s 1 ml trombocytárního lyzátu. Hodnota absorbance by měla být úměrná koncentraci proteinů. Nejvyšší hodnotu absorbance měl vzorek kapslí rozpuštěných ve vodném oplachu po chloroformu, kde by se podle naší domněnky mělo nacházet nejvyšší množství. Ovšem také předpokládáme, že obsah proteinů pouze ve vodném roztoku by měl být celkový obsahem proteinů v kapslích. Množství proteinů ve vodném oplachu by mělo ukazovat, jaké množství proteinů je sbaleno uvnitř kapslí, v chloroformu naopak mimo a na povrchu. Tato metoda potřebuje pro naše účely ještě optimalizovat, vzhledem k tomu, že hodnoty absorbance u vzorků PVA byla vyšší než jsme předpokládali. To ale může být zapříčiněno vzájemnou interakcí činidla s roztokem PVA, technologickou chybou či chybou při přípravě vzorků.





Graf 4: Množství proteinu dle Bradfordové v kapslích



Závěr

Účelem práce byla výroba trombocytárního lyzátu a optimalizace výroby kapslí obsahující trombocytární lyzát. Trombocytární lyzát byl vyroben dvěma metodami a obsahoval různé druhy růstových faktorů – proteinů (Tab. 3). Prokázali jsme, že po stočení v centrifuze je v peletách minimální množství proteinů a naopak nejvyšší koncentrace se nachází v supernatantu (Příloha B3). Druhá příprava lyzátu (podle upravené [71]) byla nejen snazší, ale domníváme se, že díky jednomu rozmrazování nedochází ke ztrátě nativity proteinů. Jednotlivé růstové faktory obsažené v trombocytárním lyzátu jsme se snažili detekovat pomocí SDS-PAGE (Obr. 18, 19), ale vzhledem k jejich vysokému množství, podobných molekulových hmotností a koncentrací by bylo potřeba 2D elektroforézy.

Průběžně jsme optimalizovali podmínky elektrostatického rozprašování. Zjistili jsme, že průměr kapslí je závislý na volbě průměru jehly a především na dávkování roztoku. Při použití jehly s průměrem 0,6 mm byla optimální hodnota dávkování kolem 0,10 -0,15 ml/hod, u jehly s průměrem 0,4 mm se nejvíce osvědčilo dávkování 0,03 ml/hod (Kapitola 2.2.5).

Dalším cílem práce byla detekce proteinů obsažených v nasprejovaných kapslích. Trombocytární lyzáty byly v kapslích detekovány pomocí SDS-PAGE s barvením Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBBR). U některých koncentrovaných vzorků jsme detekovali množství proteinů, ovšem neustále se pohybujeme na hranici detekčního limitu metody. Byly by vhodné zkoušet barvení stříbrem, čímž by se mohlo dosáhnout vyšší citlivosti metody.

Pro zjištění celkové koncentrace proteinů jsme zkoušeli i metodu podle Bradfordové. Výsledky kalibračního roztoku BSA (Graf 2) i ředění trombocytárního lyzátu (Graf 3) dle předpokladu. Touto metodou byly analyzovány vzorky z posledního experimentu (PVA kapsle s trombocytárním lyzátem po 2 doby sprejování, kapitola 2.2.5). Bylo zjištěno, že nejvíce proteinů je obsaženo ve vodném roztoku po odpipetování chloroformu (Graf 4), což značí, že nejvyšší množství



proteinů je obsaženo uvnitř kapslí. Tyto výsledky by bylo potřeba ještě potvrdit dalšími pokusy.

Další práce by měly být zaměřeny na biologické testování na podporu proliferace buněk na scaffoldu s enkapsulovanými trombocytárními lyzáty, enkapsulace trombocytárního lyzátu do jiných polymerů jako např. PLGA, řízené uvolňování látky. Další možností by byla výroba a použití lyofilizovaného trombocytárního přípravku. Určitě se budou opakovat tyto pokusy znovu a lépe analyzovat jednotlivé výsledky. Je potřeba zlepšit citlivost analýzy proteinu na elektroforéze a to pomocí barvení stříbrem, které by mělo detekovat i menší množství proteinu. Dále je potřeba si osvojit metodu podle Bradfordové a zkusit výsledky porovnávat s jinou metodou na zjišťování koncentrace proteinů, např. fluorometrií.



Reference

- [1] GRIFFITH, L. G. Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science* [online]. vol. 295, issue 5557, s. 1009-1014 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1126/science.1069210.
- [2] CHRIST, G. J., J. M. SAUL, M. E. FURTH a K.-E. ANDERSSON. The Pharmacology of Regenerative Medicine. *Pharmacological Reviews*. 2013-04-16, vol. 65, issue 3, s. 1091-1133. DOI: 10.1124/pr.112.007393.
- [3] Laboratory for Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Tissue Engineering. *Molecular Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011 [cit. 2015-04-11].
- [4] YANG, Shoufeng, Kah-Fai LEONG, Zhaohui DU a Chee-Kai CHUA. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering* [online]. 2001, vol. 7, issue 6, s. 679-689 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1089/107632701753337645
- [5] MA, Zuwei, Masaya KOTAKI, Ryuji INAI a Seeram RAMAKRISHNA. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Engineering* [online]. 2005, vol. 11, 1-2, s. 101-109 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1089/ten.2005.11.101.
- [6] CHAN, B. P. a K. W. LEONG. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. 2008, vol. 17, S4, s. 467-479. DOI: 10.1007/s00586-008-0745-3.
- [7] FURTH, Mark E., Anthony ATALA a Mark E. VAN DYKE. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* [online]. 2007, vol. 28, issue 34, s. 5068-5073 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.042.
- [8] MANO, J.F., G.A. SILVA, H.S. AZEVEDO, P.B. MALAFAYA, R.A. SOUSA, S.S. SILVA, L.F. BOESEL, J.M. OLIVEIRA, T.C. SANTOS, A.P. MARQUES, N.M. NEVES, R.L. REIS Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of*



The Royal Society Interface [online]. 2007, vol. 4, issue 17, s. 999-1030 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1201/9780203491232.ch9.

- [9] KARP, Jeffrey M., Paul D. DALTON a Molly S. SHOICHET. *Scaffolds for Tissue Engineering* [PDF]. 2003 [cit. 05-04-2015]. Dostupné z: http://www.karplab.net/papers/Karp_et_al___Scaffolds_for_Tissue_Engineering.pdf
- [10] FREED, Lisa E., Gordana VUNJAK-NOVAKOVIC, Robert J. BIRON, Dana B. EAGLES, Daniel C. LESNOY, Sandra K. BARLOW a Robert LANGER. Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. *Bio/Technology*. 1994, vol. 12, issue 7, s. 689-693. DOI: 10.1038/nbt0794-689.
- [11] BABENSEE, Julia E., James M. ANDERSON, Larry V. MCINTIRE a Antonios G. MIKOS. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 1998, vol. 33, 1-2, s. 111-139 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/S0169-409X(98)00023-4.
- [12] BOLAND, Eugene, Gary WNEK, David SIMPSON, Kristin PAWLOWSKI a Gary BOWLIN. TAILORING TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS USING ELECTROSTATIC PROCESSING TECHNIQUES: A STUDY OF POLY(GLYCOLIC ACID) ELECTROSPINNING. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 2001-11-30, vol. 38, issue 12, s. 1231-1243. DOI: 10.1081/MA-100108380.
- [13] WISLET-GENDEBIEN, Edited by Sabine. *Advances in regenerative medicine*. Rijeka: Intech, 2011. ISBN 978-953-3077-321.
- [14] NAM, Yoon Sung a Tae Gwan PARK. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 1999, vol. 47, issue 1, s. 8-17 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1002/(sici)1097-4636(199910)47:1<8::aid-jbm2>3.0.co;2-l.
- [15] MIKOS, Antonios G. y TEMENOFF, Johnna S.. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electron. J. Biotechnol.* [online]. 2000, vol.3, n.2 [citado 2015-04-05], pp. 23-24 .



- [16] JAYAWARNA, V., M. ALI, T. A. JOWITT, A. F. MILLER, A. SAIANI, J. E. GOUGH a R. V. ULIJN. Nanostructured Hydrogels for Three-Dimensional Cell Culture Through Self-Assembly of Fluorenylmethoxycarbonyl–Dipeptides. *Advanced Materials*. 2006-03-03, vol. 18, issue 5, s. 611-614. DOI: 10.1002/adma.200501522.
- [17] LU, Tingli, Yuhui LI a Tao CHEN. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 2013, č. 8, s. 337-350. DOI: 10.2147/IJN.S38635.
- [18] DORAISWAMY, A., T. PATZ, R. NARAYAN, B. CHICHKOV, A. OVSIANIKOV, R. HOUBERTZ, R. MODI, R. AUYEUNG a D. B. CHRISEY. Biocompatibility of CAD/CAM ORMOCER polymer scaffold structures. In: *MRS Proceedings*. 2004, s. -. ISSN 1946-4274. DOI: 10.1557/PROC-845-AA2.4.
- [19] SUBIA, B., J. KUNDU a S. C. Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering*. InTech, 2010-03-01. DOI: 10.5772/8581.
- [20] LUKÁŠ, D., A. SARKAR, L. MARTINOVÁ, K. VODSEDÁLKOVÁ, D. LUBASOVÁ, J. CHALOUPEK, P. POKORNÝ, P. MIKEŠ, J. CHVOJKA a M. KOMÁREK. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Textile Progress* [online]. 2009-05-29, vol. 41, issue 2, s. 59-140 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1080/00405160902904641.
- [21] JAWOREK, A., 2007. Micro- and Nanoparticle Production by Electrospraying. *Powder Technology*. Vol. 176, no. 1, s. 18-35.
- [22] HU, Xiuli, Shi LIU, Guangyuan ZHOU, Yubin HUANG, Zhigang XIE a Xiabin JING. 2014. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release* [online]. 185: 12-21 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.04.018. ISSN 01683659.



- [23] JAWOREK, A., 2009. Nanocomposite Fabric Formation by Electrospinning and Electrospraying Technologies. *Journal of Electrostatics*. Vol. 67, no. 2–3, s. 435–438.
- [24] KLÁPŠŤOVÁ, Ing. Andrea. *Využití elektrosprayingu pro cílené dodávání léčiv a funkcionalizaci scaffoldů*. Liberec, 2014. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci, Fakulta textilní. Vedoucí práce Ing. Petr Mikeš, Ph.D.
- [25] LARRONDO L., St. John MANLEY R. (1981) Electrostatic fiber spinning from polymer melts.
I. Experimental observations on fiber formation and properties. *J Polym Sci: Polym Phys Ed* 19(6):909–920. doi:10.1002/pol.1981.180190601
- [26] SUKIGARA S, GANDHI M, AYUTSEDE J, MICKLUS M, KO F (2003) Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning—part 1: Processing parameters and geometric properties. *Polymer* 44(19):5721–5727. doi:10.1016/s0032-3861(03)00532-9
- [27] LI, Zhenyu a Ce WANG. Effects of Working Parameters on Electrospinning: revue littéraire mensuelle. *One-Dimensional Nanostructures* [online]. s. 15 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1007/978-3-642-36427-3_2.
- [28] HUANG, Chaobo, Shuiliang CHEN, Chuilin LAI, Darrell H RENEKER, Haiyan QIU, Ying YE a Haoqing HOU. Electrospun polymer nanofibres with small diameters. *Nanotechnology* [online]. 2006-03-28, vol. 17, issue 6, s. 1558-1563 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1088/0957-4484/17/6/004.
- [29] SMITH, D. P. H., 1986. The Electrohydrodynamic Atomization of Liquids. *IEEE Transactions on Industry Applications*. Vol. 22, no. 3, s. 527–535.
- [30] FEYNMAN, R. P. a kol., 2006. *Feynmanovy přednášky z fyziky 2*. Praha: Fragment. 808 s. ISBN 8072004204.
- [31] DEITZEL, J.M, J KLEINMEYER, D HARRIS a N.C BECK TAN. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* [online]. 2001, vol. 42, issue 1, s. 261-272 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1016/S0032-3861(00)00250-0.
- [32] MIT-UPPATHAM, Chidchanok, Manit NITHITANAKUL a Pitt SUPAPHOL. Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on



Morphology and Average Fiber Diameter. *Macromolecular Chemistry and Physics* [online]. 2004-11-26, vol. 205, issue 17, s. 2327-2338 [cit. 2015-05-01]. DOI: 10.1002/macp.200400225.

- [33] BOCK, N. a kol., 2012. Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art. *Progress in Polymer Science*. Vol. 37, no. 11. s. 1510-1551.
- [34] WILCZEWSKA, Agnieszka Z., Katarzyna NIEMIROWICZ, MARKIEWICZ a Halina CAR. 2012. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological reports* [online]. Kraków, Poland: Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences, (64, 1020-1037) [cit. 2015-05-07]. ISSN 2299-5684.
- [35] KUMARI, Avnesh, Sudesh Kumar YADAV a Subhash C. YADAV. 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. **75**(1): 1-18 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001. ISSN 09277765
- [36] NEDOVIC, V., 2011. An Overview of Encapsulation Technologies for Food Applications. *Procedia Food Science*. Vol. 1, s. 1806–1815.
- [37] ARSHADY, Ed. by Reza. *Microspheres, microcapsules*. London: Citus books, 1999. ISBN 09-532-1872-4.
- [38] KEWAL, K.J. *Drug delivery systems*. Totowa, NJ: Humana, c2008, x, 251 p. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 437. ISBN 9781597452106-.
- [39] YE, M. a kol., 2010. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *Journal of Controlled Release*. Vol. 146, no. 2, s. 241-260.
- [40] LIU, Jie, Zhiye QIU, Shenqi WANG, Lei ZHOU a Shengmin ZHANG. A modified double-emulsion method for the preparation of daunorubicin-loaded polymeric nanoparticle with enhanced in vitro anti-tumor activity. *Biomedical Materials* [online]. 2010-12-01, vol. 5, issue 6, s. 065002- [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1088/1748-6041/5/6/065002.
- [41] LEAL-CALDERON, Fernando, Jérôme BIBETTE a Véronique SCHMITT. Double Emulsions. *Emulsion Science*. New York, NY: Springer New York, 2007, s. 173-199. DOI: 10.1007/978-0-387-39683-5_7.



- [42] JAYASURIYA, A. Champa a Anthony J. DARR. Controlled release of cisplatin and cancer cell apoptosis with cisplatin encapsulated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Journal of Biomedical Science and Engineering*. 2013, vol. 06, issue 05, s. 586-592. DOI: 10.4236/jbise.2013.65074.
- [43] BURGESS, D.J, D. J. BURGESS a J. E. CARLESS. Practical analysis of complex coacervate systems. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1990, vol. 140, issue 1, s. 251-260 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1021/bk-1986-0302.ch021.
- [44] Chemical Based Microencapsulation Technologies: Coacervation. *Microencapsulation Innovations* [online]. 2011 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://microencapsulationinnovations.com/Chemical.html#Coacervation>
- [45] GHARSALLAOUI, Adem, Gaëlle ROUDAUT, Odile CHAMBIN, Andrée VOILLEY a Rémi SAUREL. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* [online]. 2007, vol. 40, issue 9, s. 1107-1121 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.foodres.2007.07.004.
- [46] Applications: Spray Drying Nozzles. *BETE: Performance Through Engineering* [online]. [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.bete.co.uk/spray-nozzle-applications/spray-drying-nozzles>
- [47] CHAKRABORTY, S. a kol., 2009. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 61, no. 12, s. 1043-1054.
- [48] SELL, Scott A, Jeffery J ERICKSEN a Gary L BOWLIN. The incorporation and controlled release of platelet-rich plasma-derived biomolecules from polymeric tissue engineering scaffolds. *Polymer International*. 2012, n/a-n/a. DOI: 10.1002/pi.4372.
- [49] ŘEZÁČOVÁ, Martina a Alena STOKLASOVÁ. *Základy biochemie lidského organismu*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2008, 123 s. ISBN 978-802-4615-103.
- [50] WAISSER, Karel. *Úvod do biologické aktivity organických sloučenin*. Vyd. 1. Hradec Králové: Gaudeamus, 2004, 122 s. ISBN 80-704-1558-4.
- [51] 3-Dimensional Protein Structures. *NCBI: Genetics Review* [online]. 1999 [cit. 2015-04-11]. Dostupné



[z:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Original8Hour/Genetics/structure.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Original8Hour/Genetics/structure.html)

- [52] GUPTA, R. B., N. K. SINGH a K. W. SHEPHERD. The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheats. *Theoretical and Applied Genetics* [online]. 1989, vol. 77, issue 1, s. 57-64 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1007/bf00292316.
- [53] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [54] Electrophoresis. *GE Healthcare Life Sciences* [online]. 2015 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z:
<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-cz/applications/electrophoresis/>
- [55] Technical Note: Western Blot. 2008. *Gibthai: Your technology partner* [online]. [cit. 2015-05-14]. Dostupné z:
www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=18
- [56] KRUGER, Nicholas J. The Bradford Method for Protein Quantitation. *Basic Protein and Peptide Protocols: Basic Protein and Peptide Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, 1994-4-26, vol.32, s. 9 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1385/0-89603-268-X:9.
- [57] BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* [online]. 1976, vol. 72, 1-2, s. 248-254 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- [58] MOORE, Jeffrey C., Jonathan W. DEVRIES, Markus LIPP, James C. GRIFFITHS a Darrell R. ABERNETHY. Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2010, vol. 9, issue 4, s. 330-357 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00114.x.



- [59] WALKER, John M. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. [online]. s. 11 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1007/978-1-59745-198-7_3.
- [60] LOWRY, Oliver H., NIRA J. ROSEBROUGH, A. LEWIS FARR a ROSE J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1951, 193:265-275 [cit. 2015-04-25].
- [61] Colorimetric Protein Assays: Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. In: *Thermo Scientific: NanoDrop Products* [online]. 2010 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: http://www.nanodrop.com/ND2/files/nanodrop_colorimetric_olv_rev_3_11_r.pdf
- [62] FREI, R., F. E. BIOSCA, M. HANDL a T. TRČ. Funkce růstových faktorů v lidském organismu a jejich využití v medicíně, zejména v ortopedii a traumatologii. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Čechoslovaca* [online]. Praha: Česká společnost pro ortopedii a traumatologii, 2008, No.4, p. 241–246 [cit. 2015-05-01].
- [63] *PhosphoSitePlus* [online]. 2003-2013 [cit. 2015-05-02]. Dostupné z: <http://www.phosphosite.org/homeAction.do>
- [64] SPORN, Michael B. a ANITA B. ROBERTS. 2012. *Peptide Growth Factors and Their Receptors II* [online]. [cit. 2015-05-14]. 727 str.
- [65] REED, Guy L., MICHAEL L. FITZGERALD a JÁNOS POLGÁR. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the “secrete” life of thrombocytes. *Blood Journal* [online]. Nov. 2000, 96 (10) 3334-3342 [cit. 2015-05-02].
- [66] PECKA, Miroslav. 2002. *Laboratorní hematologie v přehledu: buňka a krevetvorba*. 1. vyd. Český Těšín: FINIDR, 160 s. ISBN 80-866-8201-3.
- [67] Platelet Granules and their secretion. *DoctorsHangout.com: A Professional Networking Site for Doctors & Medical Students Worldwide* [online]. 2012 [cit.



<http://www.doctorshangout.com/profiles/blog/list?tag=platelet>

- [68] MARX, Robert E. 2001. Platelet-Rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dentistry* [online]. 10(4) [cit. 2015-05-14].
- [69] CHEN, Bo, Hai-Hua SUN, Han-Guo WANG, Hui KONG, Fa-Ming CHEN a Qing YU. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. *Biomaterials* [online]. 2012, vol. 33, issue 20, s. 5023-5035 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.057.
- [70] SANTO, Vítor E., Ana Rita C. DUARTE, Elena G. POPA, Manuela E. GOMES, João F. MANO a Rui L. REIS. Enhancement of osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells by the controlled release of platelet lysates from hybrid scaffolds produced by supercritical fluid foaming. *Journal of Controlled Release* [online]. 2012, vol. 162, issue 1, s. 19-27 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.06.001.
- [71] SCHALLMOSER, Katharina a Dirk STRUNK. Preparation of Pooled Human Platelet Lysate (pHPL) as an Efficient Supplement for Animal Serum-Free Human Stem Cell Cultures. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2009, issue 32, s. - [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.3791/1523.
- [72] ROCHE APPLIED SCIENCE. *Lab FAQs: Find a Quick Solution*. 3rd Edition. Mannheim. ISBN 3-88630-245-8.



Seznam příloh

Příloha A – Trombocytární přípravek z BC


Příloha B – SDS-PAGE

Příloha C – Metoda podle Bradfordové

Příloha D – Přiložené CD



Příloha A – Trombocytární přípravek z BC

 **Krajská nemocnice Liberec, a.s.**
nemocnice Liberec nemocnice Turnov

ZÁZNAM TRANSFUZNÍHO ODDĚLENÍ

Předávací záznam

Datum: *10. 9. 2014*

Parametry TRS:

TRS ID	Koncentrace trombocytů [$10^6/\text{ml}$]	Objem [ml]	Pozn.
<i>TRSA 06140910</i>	<i>$715 \times 10^6/\text{ml}$</i>	<i>340</i>	<i>3 raly</i>

Koncentráty trombocytů (TRS) byly vyrobeny z krve 4 dárců screeningově otestovaných na přítomnost infekčních markerů HBV, HCV, HIV a treponema pallidum metodami:

MONOLISA HBs Ag ULTRA
GENSCREEN® ULTRA HIV Ag-Ab
MONOLISA™ HCV Ag-Ab ULTRA
SYPHILIS EIA II

Virologická kontrola:

Výsledek *NEGATIVNÍ* datum *10. 9. 14* podpis *Ing. Petra Svoboda*

Koncentráty trombocytů (TRS) je nutno stále pokládat za potenciálně infekční materiál a zacházet s nimi je nutné dle pravidel pro zacházení s infekčním materiálem.

Zapracoval: J. Svoboda

ZA TUL:

Převzal: *[signature]* datum *11. 9. 2014* podpis *J. Svoboda*

Příloha A 1: Předávací protokol TRS, ze kterého byl vytvářen lyzáát



Příloha A 2: Informace o roztoku Composol

Composol [®] PS	
Výrobce	Fresenius Kabi AG-61346 Bad Homburg-Německo
Použití	Výměnný roztok určený pro zpracování a skladování koncentrátů krevních destiček připravených metodou separace „buffy coat“ Poměr plazmy a roztoku je 30:70.
Složení	Natrii citras dihydricus 3,213 g, Natrii acetat trihydricus 2,22 g, Natrii chloridum 5,26 g, Natrii gluconate 5,02 g, Kalli chloridum 0,373, Magnesii chloridum hexahydricum 0,305 g, Aqua pro injectione ad 1000 ml



Příloha B – SDS-PAGE

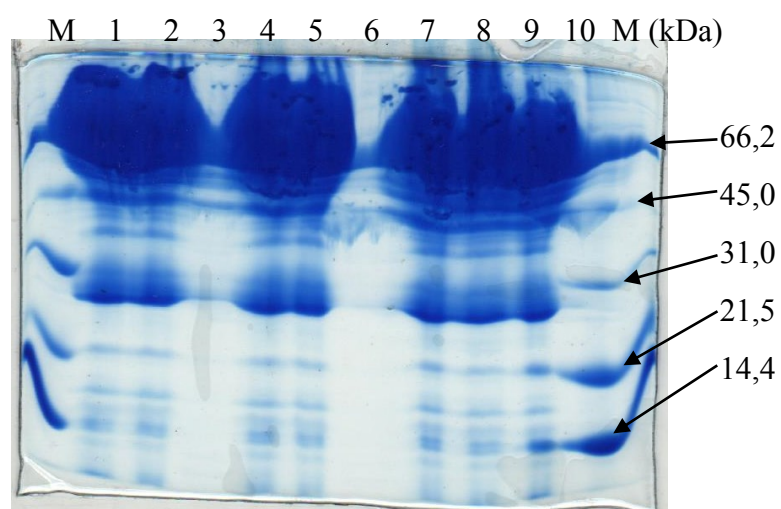
Příloha B 1: Tabulka složení 5% zaostřovací gel pro denaturační SDS-PAGE [72]

Components	Volume of components (ml) per gel mold volume of							
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% acryl-bisacrylamide mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.5 M Tris (pH 8.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% ammonium persulfate	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Příloha B 2: Tabulka složení jednotlivých gelů s různou koncentrací akrylamidu - rozdělovací gel pro SDS-PAGE [72]

% Gel	Components	Volume of components (ml) per gel mold volume of							
		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%	H ₂ O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.50
	30% acryl-bisacrylamide mix	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.00
	1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.50
	10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.50
	10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.50
	TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%	H ₂ O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.20
	30% acryl-bisacrylamide mix	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.30
	1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	1.0	12.50
	10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.50
	10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.50
	TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%	H ₂ O	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.80
	30% acryl-bisacrylamide mix	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.70
	1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.50
	10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.50
	10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.50
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%	H ₂ O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.50
	30% acryl-bisacrylamide mix	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.00
	1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.50
	10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.50
	10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.50
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%	H ₂ O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.50
	30% acryl-bisacrylamide mix	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.00
	1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.50
	10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.50
	10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.50
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02





Príloha B 3: 12% SDS-PAGE trombocytárního lyzátu, vzorky: 1 - TRS lyzát po 1. rozmrazení, 2 - TRS lyzát po 1. rozmrazení supernatant, 3 - TRS lyzát po 1. rozmrazení pelety, 4 - TRS lyzát po 2. rozmrazení, 5 - TRS lyzát po 2. rozmrazení supernatant, 6 - TRS lyzát po 2. rozmrazení pelety, 7 - TRS lyzát po 3. rozmrazení, 8 - TRS lyzát po 3. rozmrazení supernatant (lednice), 9 - TRS lyzát po 3. rozmrazení supernatant (mrazák), 10 - TRS lyzát po 3. rozmrazení pelety, M - Marker Wide Range K494



Příloha C – Metoda podle Bradfordové

Příloha C 1: Původní tabulka změřených absorbancí pro kalibrační křivku BSA

c [mg/ml]	0	1	2	4	6	8	10	
BSA (1)	0,52	0,541	0,583	0,634	0,704	0,836	0,857	570

Příloha C 2: Původní tabulka změřených absorbancí pro kalibrační křivku ředěných trombocytárních lyzátů

	blank pbs	100x	200x	400x	800x	
ředění TL	0,519	0,822	0,67	0,609	0,564	570

Příloha C 3: Původní tabulka změřených absorbancí PVA kapslí při 570 nm

	voda	chloroform	voda/chlor	
	1	2	3	4
A	0,504	0,579	0,563	PVA 20min
B	0,498	0,561	0,56	PVA 40min
C	0,578	0,555	0,596	PRP 20min
D	0,55	0,583	0,722	PRP 40min
E	0,519	1,223	0,043	
F	PVA	PVA+PRP		



Příloha D – Přiložené CD

KOPŘISOVÁ BARBORA BP 2015.docx

KOPŘISOVÁ BARBORA BP 2015.pdf

